

# **Strukturelle Analyse der Reninfreisetzung in juxtaglomerulären Epitheloidzellen**

## **DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
Dominik Steppan  
aus Regensburg  
im Jahr 2012

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Februar 2009 bis Oktober 2012 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 04.10.2012

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

Prüfungskommission: Vorsitzende: Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner

1. Prüfer: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

2. Prüfer: Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. Ralph Witzgall

Unterschrift: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System .....	11
2.2. Reninsynthese und -sekretion in der juxtaglomerulären Epitheloidzelle .....	13
2.3. Regulation der Reninsynthese und -sekretion .....	14
2.3.1. Regulation durch lokale und systemische Faktoren .....	14
2.3.1.1. Systemischer Blutdruck .....	14
2.3.1.2. Salzhaushalt.....	15
2.3.1.3. Sympathisches Nervensystem.....	17
2.3.1.4. Angiotensin II.....	17
2.3.1.5. Weitere Hormone und Autacoide .....	18
2.3.2. Regulation auf zellulärer Ebene .....	19
2.3.2.1. Zyklisches AMP und der cAMP-Signalweg .....	19
2.3.2.2. Intra- und extrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration .....	20
2.3.2.3. Zyklisches GMP und der cGMP-Signalweg .....	21
2.4. Sekretionsmechanismen .....	22
2.4.1. Der klassische regulierte Sekretionsmechanismus .....	23
2.4.1.1 SNARE-Proteine und der SNARE-Komplex .....	23
2.4.1.2. Der SNARE-Zyklus.....	24
2.4.1.3. Rab-Proteine und Rab-Effektoren.....	27
2.4.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine.....	28
2.4.2. Der „Kiss-and-Run“-Mechanismus .....	29
2.4.3. Die regulierte lysosomale Sekretion .....	29
2.4.4. Der Compound-Exozytose-Mechanismus .....	30
2.5. Zielsetzung.....	32
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.1. Material .....	36
3.1.1. Geräte.....	36
3.1.2. Verbrauchsmaterial.....	37
3.1.3. Chemikalien, Enzyme, Kits.....	38

3.1.4. Primer .....	40
3.1.5. Antikörper .....	40
3.1.6. Puffer und Lösungen .....	42
3.1.7. Software und Internetdienste .....	45
3.2. Methoden.....	45
3.2.1. Versuchstiere.....	45
3.2.2. Histologie.....	46
3.2.2.1. Fixierung des Nierengewebes .....	46
3.2.2.2. Einbettung in Paraffin .....	46
3.2.2.3. Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung .....	47
3.2.2.4. Immunohistochemische Färbung.....	47
3.2.2.5. Lichtmikroskopie - Akquisition und Digitalisierung.....	49
3.2.3. Isoliert perfundierte Niere (IPN) .....	49
3.2.3.1. Präparation der Nieren .....	49
3.2.3.2. Pharmakologische Stimulation der Reninsekretion .....	50
3.2.3.4. Fixierung des Nierengewebes .....	50
3.2.4. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	50
3.2.4.1. Einbettung und Trimmen .....	50
3.2.4.2. Anfertigen von Ultradünnschnitten .....	52
3.2.4.3. Kontrastieren der Schnitte .....	52
3.2.4.4. Elektronenmikroskopie - Akquisition und Digitalisierung.....	52
3.2.5. Dreidimensionale Rekonstruktion.....	53
3.2.5.1. Datenaufbereitung mittels ImageJ.....	53
3.2.5.2. Rekonstruktion mittels Amira .....	53
3.2.6. Molekularbiologische Methoden .....	55
3.2.6.1. Genotypisierung.....	55
3.2.6.2. Bestimmung der Reninaktivität.....	56
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
4.1. Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Wildtyp-Maus.....	58
4.1.1. Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen.....	58
4.1.2. Untersuchung von stimulierten JG-Zellen.....	60
4.1.2.1. Messung der Reninsekretionsrate unter kontrollierten Bedingungen .....	61
4.1.2.2. Stimulation mit Isoproterenol.....	62
4.1.2.3. Stimulation mit EGTA .....	64

4.1.2.4. Stimulation mit Isoproterenol und EGTA .....	67
4.2. Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Beige-Maus.....	78
4.2.1. Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen einer Beige-Maus .....	79
4.2.2. Untersuchung von stimulierten JG-Zellen einer Beige-Maus .....	82
4.2.2.1. Messung der Reninsekretionsrate unter kontrollierten Bedingungen .....	82
4.2.2.2. Stimulation mit Isoproterenol und EGTA .....	83
4.3. Morphologie der Speichervesikel in JG-Zellen einer Ren-1d-Cre/Cre-Maus .....	86
4.4. Immunhistochemische Untersuchung von JG-Zellen.....	89
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1. Die Morphologie von Reninspeichervesikeln in JG-Zellen des Wildtyps .....	93
5.2. Der Exozytosemechanismus in JG-Zellen .....	94
5.3. Untersuchungen der Vesikelmorphologie in JG-Zellen der Beige-Maus .....	100
5.4. Untersuchungen der Vesikelmorphologie in JG-Zellen der Ren-1d-Cre/Cre-Maus .....	102
5.5. Histologischer Nachweis von SNARE-Proteinen in JG-Zellen .....	103
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>130</b>
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	130
7.2. Abkürzungsverzeichnis.....	132
7.3. Veröffentlichungen .....	135
7.4. Danksagung .....	135

## **1. Zusammenfassung**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System ist von übergeordneter Wichtigkeit für die Kontrolle des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers. Sowohl die Regulation als auch der genaue Mechanismus der Reninsekretion aus den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Niere, wird schon seit geraumer Zeit untersucht. Während zur Regulation der Reninsekretion eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten verfasst wurde, ist der genaue Sekretionsmechanismus noch relativ ungeklärt. Die klassische Mikroskopie mit Hilfe eines Transmissions-elektronenmikroskops (TEM) lieferte bisher wenig Hinweise auf einen klassischen Sekretionsmechanismus, wie beispielsweise Kontakte von Vesikel- und Zellmembran oder Omega-Strukturen bei JG-Zellen. Darüber hinaus existieren widersprüchliche Angaben hinsichtlich der Morphologie und des Verhaltens der Reninspeichervesikel unter normalen sowie unter extrazellulären Bedingungen, welche die Reninsekretion stimulieren. Dies ist zum Einen sicherlich in der relativen Schwierigkeit, Exozytoseereignisse auf TEM-Aufnahmen sichtbar zu machen und zum Anderen in der geringen Anzahl von Exozytoseereignissen bei JG-Zellen in vivo begründet. Zudem liefern statische 2-dimensionale TEM-Aufnahmen nur ein unvollständiges Bild der Vesikelmorphologie und lassen großen Spielraum für Spekulationen. Aus diesem Grund wurden im Zuge dieser Arbeit die Morphologie und der Exozytosemechanismus der Reninspeichervesikel mit Hilfe von aus TEM-Aufnahmen erstellten 3-dimensionalen Teilrekonstruktionen von JG-Zellen untersucht. Die Rekonstruktionen wurden sowohl von Zellen unstimulierter Mauseieren, als auch von Zellen von Mauseieren, deren Reninsekretionsrate mit Hilfe der Arbeitstechnik der isoliert perfundierten Mauseiere (IPN) in vivo pharmakologisch stimuliert und gemessen wurde, erstellt. Dabei wurden pro Stimulationsstufe JG-Zellen mehrerer Nieren elektronenmikroskopisch untersucht und daraufhin von maximal zwei repräsentativen Zellen beispielhaft 3-dimensionale Modelle aus TEM-Aufnahmen von 50-100 nm dicken Ultradünnschnitten erstellt. Untersuchungen an unstimulierten und mit steigender Intensität stimulierten Wildtyp-Zellen ergaben, dass viele Reninspeichervesikel keine klassisch runde Form aufweisen, sondern miteinander in Kontakt stehen und so ein sogenanntes Speichernetzwerk bilden. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels Isoproterenol oder Erniedrigung der extrazellulären Calcium-Konzentration mittels EGTA führte zu einer Stimulation der Reninsekretionsrate und zu einer Erhöhung des Vernetzungs-

grads der Reninspeichervesikel. Die Methode der 3-dimensionalen Rekonstruktion lieferte dabei, im Gegensatz zu den nur 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen, eine praktikable Möglichkeit, den Vernetzungsgrad der Reninspeichervesikel zu beobachten und zu protokollieren. Desweiteren konnten bei hohen Stimulationsstufen Exozytoseereignisse beobachtet werden, deren Zahl jedoch bei noch höherer Stimulation konstant blieb, obwohl die Reninsekretionsrate weiter zunahm. Es ist anzunehmen, dass eine intrazelluläre Verschmelzung von Vesikelmembranen, welche in Renin produzierenden Zellen bereits beobachtet wurde, für einen erhöhten Ausstoß von aktivem Renin in den Intrazellulärraum verantwortlich ist. Ein derartiger Ausstoß von gespeichertem Material wird als Compound-Exozytose bezeichnet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden stimulierte und unstimulierte JG-Zellen von C57BL/6J-*Lyst*<sup>bg-J</sup>/J-Mäusen untersucht. Der Phänotyp dieser Tiere ähnelt der Chediak-Higashi-Krankheit beim Menschen. Das bei diesem Genotyp ausgeknockte *LYST*- bzw. *CHS1*-Gen kodiert für das sogenannte lysosomal trafficking (*LYST*) Protein, welches auf bisher unbekannte Weise an der korrekten Ausbildung von lysosomalen Organellen beteiligt ist. Dementsprechend treten bei diesen, auch Beige-Mäuse genannten Tieren in mehreren Zellarten abnormal vergrößerte lysosomale Organellen und Granulen auf. Desweiteren weisen die JG-Zellen dieser Tiere eine abnormale Morphologie der Reninspeichervesikel auf. In der Tat waren sowohl in den für diese Arbeit angefertigten 3-dimensionalen Rekonstruktionen als auch auf TEM-Aufnahmen die Reninspeichervesikel der Beige-JG-Zellen deutlich vergrößert. Vier bis fünf sehr große, unregelmäßig geformte Reninspeichervesikel füllten fast das gesamte Zellvolumen der rekonstruierten Zellen aus. Dies scheint die Theorie einiger Arbeitsgruppen, die postulieren, dass die sekretorischen Vesikel der JG-Zellen modifizierte sekretorische Lysosomen sind, zu bestätigen. Unter Bedingungen, welche die Reninsekretionsrate stimulierten, konnten Exozytoseereignisse bei Beige-JG-Zellen beobachtet werden. Die Reninsekretionsrate der Beige-Mausnieren unterschied sich bei gleichen Stimulationsbedingungen nicht signifikant von der von Wildtyp-Mausnieren. Es ist anzunehmen, dass eine Fusion von Vesikel- und Zellmembran bei JG-Zellen im Allgemeinen nicht auf kleine Reninspeichervesikel beschränkt ist, sondern auch bei sehr großen Kavernenartigen Vesikeln, wie sie in der Beige-Zelle auftreten, stattfindet.



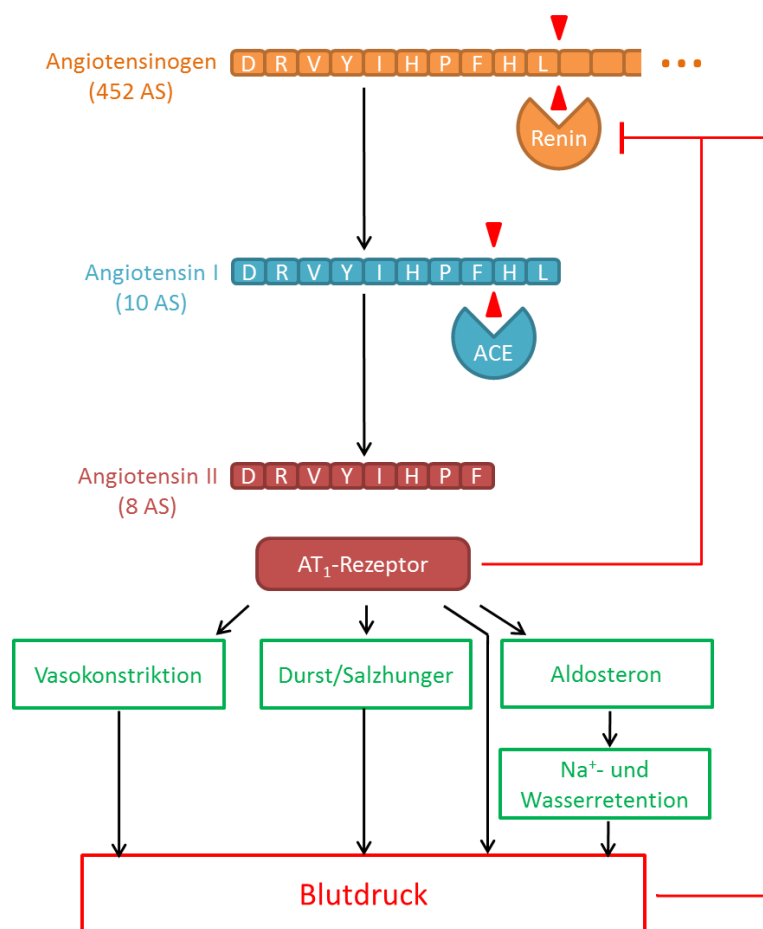
Im dritten Teil der vorliegenden Dissertation wurden unstimulierte JG-Zellen von Ren-1d-Cre/Cre-Mäusen 3-dimensional rekonstruiert. Diese Mäuse produzieren kein funktionelles Ren-1-Protein mehr. Es wird schon lange vermutet, dass nur das Ren-1-Protein in sekretorischen Vesikeln gespeichert und durch regulierte Exozytose sezerniert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diesen Befund. Die in den erstellten 3-dimensionalen Rekonstruktionen sichtbaren Vesikel waren gegenüber Reninspeichervesikeln des Wildtyps deutlich verkleinert und erschienen auf TEM-Aufnahmen weniger elektronendicht als diese. Es hat den Anschein, dass die in den Ren-1d-Cre/Cre-Zellen gefundenen Strukturen eher die prinzipielle Fähigkeit der Reninzellen widerspiegeln, Speichervesikel zu bilden, und dass in ihnen kein funktionelles Renin-Protein gespeichert wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, SNARE-Proteine und Proteine, die mit ihnen interagieren, auf immunhistochemischem Weg mittels Fluoreszenzfärbung nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden 5µm dicke Paraffin- oder Cryoschnitte von Nierengewebe angefertigt, an denen die JG-Zellen gefärbt wurden. Als Vergleichsgewebe und Positivkontrolle diente Gewebe von typischen (Pankreas, Nebenniere) und atypischen (Schilddrüse, Nebenschilddrüse) endo- und exokrinen Drüsen. In dieser Arbeit konnten auf immunhistochemischem Weg keine der von uns untersuchten Proteine nachgewiesen werden. Entweder ist keines der in dieser Arbeit untersuchten Proteine am Exozytosemechanismus der JG-Zellen beteiligt, oder diese Proteine liegen in den JG-Zellen in sehr geringer, nicht mit Hilfe von Antikörpern nachweisbarer Konzentration vor.

## 2. Einleitung

## 2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Elektrolyt- und Wasserhaushalts und damit des Blutdrucks. Seit der Entdeckung des Proteins Renin durch Tigerstedt und Bergmann vor mehr als 100 Jahren (Tigerstedt und Bergmann, 1898) ist das RAAS das Ziel umfassender und aufwändiger Studien, aus denen sogenannte RAAS-Inhibitoren als wichtige pharmakologische Werkzeuge zur Bekämpfung von Bluthochdruck, Herzinfarkten und diabetischen Nierenerkrankungen hervorgingen. Obwohl sich das Verständnis des RAAS in den letzten Jahren durch die Entdeckung neuer funktionaler Komponenten stark verbessert hat, behält der schon lange bekannte klassische Signalweg aus Renin, Angiotensin und Aldosteron, welchem das RAAS seinen Namen verdankt, seine Gültigkeit (Abb. 1). Das Substrat des Systems ist Angiotensinogen, ein  $\alpha$ -Glykoprotein,



**Abb. 1: Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.**  
(AS = Aminosäure, ACE = Angiotensin Converting Enzyme)

welches in der Leber produziert und dort in den Blutkreislauf sezerniert wird (Deschepper et al., 1986; Hall, 2003; Menard et al., 1983). Die Aspartylprotease Renin wird fast ausschließlich von den juxtaglomerulären Epitheloidzellen der Niere gebildet und ebenfalls in den Blutkreislauf sezerniert, wo sie vom Oligopeptid Angiotensinogen das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) abspaltet (Hackenthal et al., 1990; Hall, 2003; Persson et al., 2004). Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), eine membrangebundene Metalloprotease die vorwiegend auf der Zellmembran von Endothelzellen des Lungenkreislaufs exprimiert wird, spaltet daraufhin von diesem Decapeptid zwei Aminosäuren ab (Hall, 2003; Ng und Vane, 1967; Soubrier et al., 1993). Es entsteht das aktive Octapeptid Angiotensin II (ANG II), der Haupteffektor des RAAS (Hall, 2003; Quinn und Williams, 1988). ANG II vermittelt seine physiologische Wirkung über die Angiotensin-Rezeptoren, welche auf Zellen des kardiovaskulären, des endokrinen und des Endothelsystems exprimiert sind (Ardaillou, 1999; de Gasparo et al., 2000; Inagami et al., 1999). Die meisten physiologischen Effekte von ANG II werden über den Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-R) vermittelt und lösen direkt oder indirekt eine Erhöhung des systemischen Blutdrucks aus (Hackenthal et al., 1990; Hall, 2003). Eine erhöhte ANG II-Konzentration im Blut führt zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstands, dem Auslösen eines Durstgefühls und Salzhunger über das zentrale Nervensystem und einer Erhöhung der Synthese und Sekretion von Aldosteron in der Nebenniere (Nguyen, 2011; Phillips und Sumners, 1998; Savoia et al., 2011). Aldosteron löst wiederum eine erhöhte renale tubuläre Na<sup>+</sup>- und H<sub>2</sub>O-Rückresorption und damit eine Erhöhung des Blutvolumens aus (Hall, 1986). Die Aktivität des RAAS hängt unter physiologischen Bedingungen von der Plasmareninkonzentration ab, da die Abspaltung von ANG I durch die Protease Renin den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ANG II-Produktion darstellt und sowohl Angiotensinogen als auch ACE im gesunden Individuum im Überfluss vorhanden sind (Kurtz, 1989; Mercure et al., 1998; Persson, 2003; Peters und Clausmeyer, 2002). Folglich ist die Synthese- und Sekretionsrate von Renin der Ansatzpunkt vieler negativer Feedback-Schleifen zum Zweck der Regulation des RAAS. Sie wird beispielsweise durch hohen systemischen Blutdruck, einen erhöhten renalen Perfusionsdruck und eine erhöhte tubuläre Kochsalzkonzentration aber auch direkt durch eine erhöhte ANG II-Konzentration gehemmt (Hackenthal et al., 1990; Kurtz et al., 1986c; Kurtz und

Wagner, 1999; Vander und Geelhoed, 1965). Neben dem klassischen RAAS existieren auch sogenannte lokale gewebespezifische Renin-Angiotensin-Systeme ausserhalb der Niere, beispielsweise im Herz, in den Blutgefäßen, in den Nebennieren, in den Ovarien und im Uterus, im Pankreas und im Gehirn, wo sie vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Organfunktionen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen spielen (Bader et al., 2001; Kobori et al., 2007; Paul et al., 2006; Re, 2004).

## **2.2. Reninsynthese und -sekretion in der juxtaglomerulären Epitheloidzelle**

In der adulten Mausnieren wird Renin von myofibroblastenartigen Zellen synthetisiert, welche in der Media-Schicht der afferenten Arteriolen in der Nähe der Glomeruli lokalisiert sind (Ganten et al., 1976; Hackenthal et al., 1990; Taugner et al., 1979). Wegen diesem Umstand und wegen ihrer kuboiden Form wurden diese Zellen als juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (JG-Zellen) bezeichnet. Beim Menschen und bei den meisten Tieren, nicht aber bei Mäusen ist Renin durch ein einzelnes Gen kodiert. Labormäuse können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Mausstämme, die ein Reningen tragen (z.B. C57/Bl6, BALB/c), welches als Ren-1c bezeichnet wird, und Mausstämme welche zwei Reningene tragen (z.B. 129SV, Swiss), welche dann als Ren-1d und Ren-2 bezeichnet werden. Es wird davon ausgegangen, dass Ren-2 aus einer Genduplikation von Ren-1 hervorgegangen ist (Abel und Gross, 1990; Dickinson et al., 1984). Alle Reningene codieren für Proteine, die auf Aminosäureebene fast vollständig homolog sind, jedoch unterschiedlich glykosyliert werden (Sigmund und Gross, 1991). So können Ren-1-Proteine an drei Asparaginresten glykosyliert werden während die Ren-2-Proteine keine Glykosylierungsstellen aufweisen. Renin wird zunächst als Prä-Pro-Renin mit einer molekularen Masse von 48kDa synthetisiert und ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo die Prä-Sequenz abgespalten wird. Das entstandene Pro-Renin wird in den Golgi-Apparat geschleust, wo es zwei Möglichkeiten der Weiterverarbeitung gibt. Das Protein kann mit Mannose-6-Phosphatresten glykosyliert werden und wird dann unter Beteiligung des Mannose-6-

Phosphatrezeptors in elektronenoptisch dichte, lysosomenartige Dense-Core-Vesikel (DCV) transportiert und dort für die regulierte Exozytose gespeichert. Ein Teil des Proteins wird jedoch nicht glykosyliert und konstitutiv in sogenannten „klaren“ Vesikeln sezerniert. Die Glykosylierung des Proteins ist also die Voraussetzung für eine regulierte Exozytose (Morris, 1992; Mullins et al., 2000). Wie oben bereits erwähnt, fehlen dem Ren-2 Protein die nötigen Glykosylierungsstellen, weshalb es für die regulierte Exozytose keine Rolle spielt und nur konstitutiv sezerniert wird. Es wird also ausschließlich Ren-1 Protein in den DCV gespeichert (Clark et al., 1997; Sharp et al., 1996). Dort wird das 43 Aminosäuren lange, n-terminale Pro-Segment des Proteins durch einen noch nicht näher verstandenen, proteolytischen Mechanismus abgespalten. Die DCV enthalten neben Prorenin mehrere Proteasen, wie zum Beispiel Cathepsin B (Neves et al., 1996), die Prohormon-Konvertase PC5 (Mercure et al., 1996) und Kallikreine (Kikkawa et al., 1998), die bei diesem Vorgang vermutlich eine wichtige Rolle spielen. Die Proteolyse wird durch den in den Vesikeln vorliegenden niedrigen pH-Wert (4-6) begünstigt. Das aktive Renin bleibt bis zur kontrollierten Freisetzung in den DCV gespeichert.

## **2.3. Regulation der Reninsynthese und -sekretion**

### **2.3.1. Regulation durch lokale und systemische Faktoren**

Wie bereits erwähnt, führt die Freisetzung von aktivem Renin zu einer vermehrten Entstehung von Angiotensin II, welches entscheidend an der Kontrolle des Blutdrucks und des Salz- und Wasserhaushalts beteiligt ist. Dementsprechend präzise ist die Reninfreisetzung durch zahlreiche lokale und systemische Faktoren reguliert.

#### **2.3.1.1. Systemischer Blutdruck**

Das Konzept eines intrarenalen, druckabhängigen Mechanismus, welcher die Reninfreisetzung reguliert, wurde zuerst von Skinner et al. (Skinner et al., 1964) formuliert. Ein Anstieg des arteriellen Blutdrucks inhibiert als Teil einer negativen Feedback-Schleife die Synthese und Sekretion von Renin, während ein Abfall des Blutdrucks zu einer Stimulation der Reninfreisetzung führt (Wagner und Kurtz, 1998).

Da dieser Effekt auch in isolierten Nieren beobachtet werden konnte (Scholz und Kurtz, 1993), ist es wahrscheinlich, dass ein renaler Barorezeptor daran beteiligt ist. Die genaue Identifizierung dieses Rezeptors ist noch ausstehend, er scheint jedoch in den reninproduzierenden Zellen selbst lokalisiert zu sein. So zeigten Experimente mit isolierten JG-Zellen eine druckabhängige Regulation der Reninsekretion, wobei zur Simulation eines erhöhten Blutdrucks die Zellen selbst mechanisch gedehnt wurden, was zu einer verminderten Reninsekretion führte (Carey et al., 1997; Ryan et al., 2000). Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch unverstanden. Es wird vermutet, dass die mechanische Dehnung der Zellmembran zu einem vermehrten Calcium-Influx durch dehnungsabhängige Calcium-Kanäle und zur Aktivierung der Phospholipase C in den JG-Zellen führt (Ryan et al., 2000). Die Abwesenheit von extrazellulärem Calcium verhindert die druckabhängige Inhibierung der Reninsekretion (Ichiara et al., 1999). Diese Calcium-Abhängigkeit wurde durch Experimente an isoliert perfundierten Mäuse- und Rattennieren bestätigt (Scholz et al., 1994; Wagner et al., 2007).

#### **2.3.1.2. Salzhaushalt**

Die nahrungsbedingte Salzaufnahme und der NaCl-Haushalt des Körpers sind seit langem bekannte Regulatoren der RAAS-Aktivität und damit der Reninsynthese und -sekretion. Niedrige orale Salzaufnahme führt zu einer vermehrten Stimulation der Reninsekretion, umgekehrt wird diese bei einer hohen oralen Salzaufnahme gehemmt (Wagner und Kurtz, 1998). Es wurde schon sehr früh postuliert, dass die Konzentration der Chlorid-Ionen im distalen Tubulus der Niere ein wichtiges Bindeglied in diesem bedeutenden Mechanismus darstellt (Vander und Miller, 1964). Demnach spielt die Macula Densa (MD), eine Ansammlung von spezialisierten Endothelzellen des distalen Tubulus, welche sich in enger Nachbarschaft zu den reninbildenden Zellen der afferenten Arteriole befindet, eine zentrale Rolle bei der Regulation der Reninaktivität. Die MD-Zellen dienen als Sensor für die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration im distalen Tubulus. Eine hohe  $\text{Cl}^-$ -Konzentration hemmt die Reninsekretion und umgekehrt (Schnermann, 1998; Skott und Briggs, 1987). Zudem wird der Gefäßwiderstand der jeweiligen afferenten Arteriole von der Macula Densa insofern beeinflusst, dass eine erhöhte Chloridionenkonzentration zur Gefäßverengung und eine niedrige Konzentration zur Gefäßdilatation führt (Castrop, 2007; Schnermann und Levine, 2003). Dieser Effekt

wird als Tubuloglomerulärer Feedback Mechanismus (TGF) bezeichnet, verhindert kapazitätsbedingten Salzverlust und trägt zur Natriumhomöostase des Körpers bei. Die genaue Wirkungsweise der MD-Zellen auf Reninsekretion und afferente Arteriole, auch „Macula Densa Mechanismus“ genannt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die MD-Zellen detektieren die tubuläre Chloridionenkonzentration mittels der Transportaktivität des in ihrer apikalen Zellmembran gelegenen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transporters (NKCC2) (Bell und Lapointe, 1997; Lapointe et al., 1990; Lorenz et al., 1991) und setzen bei einer hohen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration ATP frei, während bei einer geringen Konzentration Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) durch erhöhte Expression von COX-2 und Stickstoffmonoxid (NO) durch erhöhte Expression von nNOS freigesetzt wird (Bell et al., 2003; Bosse et al., 1995; Harris et al., 1994; Peti-Peterdi et al., 2003; Yang et al., 2000).  $\text{PGE}_2$  und NO wirken kurzfristig stimulierend auf die Reninsekretion (Friis et al., 2005; Kurtz und Wagner, 1998). Das Abbauprodukt von ATP, Adenosin, hemmt die Reninsekretion und bewirkt außerdem eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriole (Churchill und Churchill, 1985; Schnermann und Levine, 2003). Im Gegensatz zur Rolle der Macula Densa und ihrer Signalmoleküle bei der Regulation des TGF wird ihre Rolle bei der Reninsekretion in letzter Zeit zunehmend in Frage gestellt. Es existieren Studien sowohl zu nNOS und eNOS (Castrop et al., 2004; Kompanowska-Jezierska et al., 2008; Sallstrom et al., 2008) als auch zu COX-2 (Harding et al., 1997; Hocherl et al., 2002; Kim et al., 2007b), die die Vermutung nahe legen, dass sowohl NO als auch  $\text{PGE}_2$  nicht essentiell für die salzabhängige Regulation der Reninsekretion sind, sondern eher eine modulierende Wirkung ausüben. Auch Versuche an A1AR Knockout Mäusen, bei denen der A1 Adenosin-Rezeptor deletiert wurde, zeigten, dass Adenosin keine Rolle bei der langfristigen Regulation der Reninsekretion spielt (Brown et al., 2006; Schweda et al., 2003). Zusammenfassend kann man sagen, dass der Macula Densa Mechanismus spontane Änderungen in der tubulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration detektiert und wichtig für die entsprechende Anpassung der Reninsekretion bei kurzfristig erhöhter tubulärer NaCl-Konzentration ist, es fehlen jedoch Beweise für die Beteiligung des MD-Mechanismus an der längerfristigen Regulation des Salzhaushalts. Es ist noch immer unklar, welche Faktoren an der langfristigen salzabhängigen Regulation der Reninsekretion beteiligt sind.



### **2.3.1.3. Sympathisches Nervensystem**

Sowohl die renalen Blutgefäße als auch das Tubulussystem, einschließlich des juxtaglomerulären Apparats, sind sympathisch innerviert (Hackenthal et al., 1990). Immunhistochemischen Studien zufolge wird der  $\beta_1$ -Adrenorezeptor auf JG-Zellen exprimiert (Boivin et al., 2001). Die Aktivierung des renalen Nervensystems und damit der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren führt unter anderem zu einer vermehrten Produktion von cAMP in den JG-Zellen, und damit zu einer gesteigerten Reninsekretionsrate (DiBona und Kopp, 1997). Desweiteren führt eine Aktivierung der  $\alpha$ -Adrenorezeptoren zu einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen und einem damit einhergehenden Druckabfall im juxtaglomerulären Bereich, was wie bereits erwähnt ebenfalls zu einer Stimulation der Reninsekretion führt (Ehmke et al., 1989; Kirchheim et al., 1985). Studien an  $\beta_1/\beta_2$ -Adrenorezeptor Knockout Mäusen, bei denen die basale Plasmareninkonzentration im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen um bis zu 85% erniedrigt waren, bestätigen, dass sympathischer Input von lokalen Nervenenden oder von zirkulierenden Catecholaminen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der basalen Reninsekretionsrate spielt (Kim et al., 2007a). Jedoch deuten weitere Experimente darauf hin, dass das lokale Nervensystem nicht essentiell für die Modulation der Reninsekretion in Reaktion auf andere Stimuli, wie z.B. die Veränderung des Salzhaushalts ist. So trat diese Modulation sowohl bei vollständiger renaler Denervation als auch bei pharmakologischer Inhibierung der  $\beta$ -Adrenorezeptoren auf (Golin et al., 2001; Holmer et al., 1993; Holmer et al., 1994). Bei einem vollständigen Knockout der  $\beta$ -Adrenorezeptoren ist die Modulation der Reninsekretion ebenfalls zu beobachten, das Ausmaß der Veränderungen der Plasmareninkonzentration ist jedoch verringert (Kim et al., 2007b). Die  $\beta_1$ -Rezeptoren scheinen notwendig zu sein um eine Reninsyntheserate zu ermöglichen, die einen großen Pool an Reninvesikeln gewährleistet. Dieser Pool an jederzeit freisetzbaren Reninvesikeln ermöglicht erst in vollem Maße die Reaktion auf andere externe Stimuli.

### **2.3.1.4. Angiotensin II**

Im Blutkreislauf zirkulierendes Angiotensin II hemmt über eine negative Rückkopplungsschleife die Reninsynthese und -sekretion (Hackenthal et al., 1990). Experimente zeigen, dass eine pharmakologische ACE-Inhibierung oder Blockade der

AT<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einer starken Erhöhung der Reninsyntheserate und -sekretionsrate führt (Castrop et al., 2003; Hocherl et al., 2001), während diese durch eine exogene Infusion mit ANG II gehemmt wird (Schunkert et al., 1992). Die Tatsache, dass der Effekt von ANG II auf die Reninsekretion unabhängig von anderen Faktoren wie z.B. renalem Perfusionsdruck oder tubulärer Salzkonzentration auftritt, deutet auf einen direkten Effekt auf die reninproduzierenden Zellen hin (Hackenthal et al., 1990; Kurtz und Wagner, 1999). Diese Theorie wurde durch den Nachweis der Expression von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren auf JG-Zellen bekräftigt (Harrison-Bernard et al., 1997; Kimura et al., 1997). Dort bewirkt ANG II eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calcium, was sich inhibierend auf die Reninsekretion auswirkt. Desweiteren ist ANG II ein starker Vasokonstriktor und hemmt die Reninsekretion auch indirekt durch eine Erhöhung des Blutdrucks (Crowley et al., 2005), bewirkt eine Aldosteron- und Adrenalinfreisetzung in der Nebenniere und verursacht ein gesteigertes Durstgefühl durch Stimulation der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren im Hypothalamus (Hackenthal et al., 1990).

#### **2.3.1.5. Weitere Hormone und Autacoide**

Die Regulation der Reninsynthese und -sekretion ist sehr komplex und wird von zahlreichen lokalen und systemischen Faktoren, Hormonen und Autacoiden beeinflusst. Neben den bereits erwähnten Faktoren wird die Reninsekretion beispielsweise ebenfalls von den Neuropeptiden „vasoactive intestinal polypeptide“ (VIP), „calcitonin gene-related protein“ (CGRP) und „pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“ (PACAP) stimuliert (Gnaedinger et al., 1989; Hautmann et al., 2007; Kurtz et al., 1988c; Porter et al., 1982; Porter et al., 1983). Desweiteren wirken auch Aldosteron, Adrenomedullin, Dopamin, Glucagon, das Parathormon (PTH) und die Thyroidhormone Thyroxin und Triiodthyronin stimulierend auf die Reninsekretion (Hauger-Klevene et al., 1977; Jensen et al., 1997a; Klar et al., 2004; Kurtz et al., 1988b; Marchant et al., 1993; Saussine et al., 1993). Hemmend auf die Reninsekretion wirken beispielsweise der Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), die Interleukine IL1 und IL6, der Platelet Activating Factor (PAF), Endotheline und Vasopressin (Jensen et al., 1998; Kurtz, 1986; Kurtz et al., 1986a; Kurtz et al., 1986b; Kurtz et al., 1991; Pan et al., 2005; Pfeilschifter et al., 1985; Todorov et al., 2002).

### **2.3.2. Regulation auf zellulärer Ebene**

Die erwähnten systemischen und lokalen Faktoren münden auf zellulärer Ebene in drei intrazelluläre Signalwege mit den Signalmolekülen cAMP, Calcium und cGMP ein.

#### **2.3.2.1. Zyklisches AMP und der cAMP-Signalweg**

Das second messenger Protein cAMP ist der primäre intrazelluläre Stimulator der Reninsekretion. Alle bereits besprochenen extrazellulären stimulierenden Faktoren vermitteln ihre Wirkung durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, sei es durch Rezeptor-induzierte Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) oder durch Hemmung von cAMP-Phosphodiesterasen (PDE). So erhöht beispielsweise in vielen Versuchsmodellen, einschließlich in vivo Experimente und Versuche mit einzelnen JG-Zellen, eine pharmakologische Stimulation der  $\beta$ -Adrenorezeptoren die cAMP-Konzentration über eine Aktivierung der Adenylatcyclase, was wiederum zu einer erhöhten Reninsekretion führt (Keeton und Campbell, 1980; Kurtz et al., 1984; Vandongen et al., 1973; Weinberger et al., 1975). Auch die direkte pharmakologische Aktivierung der Adenylatcyclase durch Forskolin wirkt in hohem Maße stimulierend auf die Reninsekretion (Grunberger et al., 2006; Kurtz et al., 1984). Die für die cAMP-Produktion in den JG-Zellen wichtigen Isoformen scheinen die Adenylatcyclasen AC-5 und AC-6 zu sein (Grunberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007b; Ortiz-Capisano et al., 2007c). Wie bereits angedeutet stimuliert auch eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterasen, welche cAMP zu 5'-AMP hydrolysieren, die Reninsekretion. So führt eine nicht-selektive Blockierung der PDE-Aktivität durch 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) zu einer gesteigerten Reninsekretionsrate. Genauere Experimente mit anderen, selektiv blockierenden pharmakologischen Wirkstoffen zeigten, dass in den JG-Zellen vermutlich die Phosphodiesterasen PDE-3 und PDE-4 verantwortlich für die cAMP-Hydrolyse sind (Chiu et al., 1996; Chiu und Reid, 1996; Chiu et al., 1999; Kurtz et al., 1998b). Der genaue intrazelluläre Mechanismus des für die Reninsekretion wichtigen cAMP-Signalwegs ist noch unklar, vermutlich wirkt ein erhöhter cAMP-Spiegel aktivierend auf die Proteinkinase A (PKA), die downstream wiederum andere, bisher unbekannte Proteine phosphoryliert (Friis et al., 2002; Kurtz et al., 1998b).

### **2.3.2.2. Intra- und extrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Wie bereits erwähnt, spielt Calcium eine atypische Rolle bei der Regulation der Reninsekretion in JG-Zellen. Im Gegensatz zu cAMP, welches der primäre Aktivator der Reninsekretion ist, wirkt Calcium als der Hauptinhibitor der Sekretion in JG-Zellen. Eine hohe intrazelluläre Calcium-Konzentration hemmt und eine niedrige Konzentration stimuliert die Reninsekretion. So vermitteln viele Hormone wie zum Beispiel Angiotensin II, Endotheline und Vasopressin ihre sekretionshemmende Wirkung durch eine Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration in den JG-Zellen (Ichihara et al., 1995; Kurtz et al., 1986c; Takagi et al., 1988; Van Dongen und Peart, 1974). Im Gegensatz dazu stimuliert eine Reduzierung der cytosolischen Calcium-Konzentration, beispielsweise durch den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA die Reninsekretion (Ortiz-Capisano et al., 2007a; Ortiz-Capisano et al., 2007c). Da bei allen anderen sekretorischen Zellen, außer bei denen der Nebenschilddrüse, eine erhöhte zytosolische Calcium-Konzentration die Exozytose fördert (Cohen et al., 1997), wird dieser Umstand auch als „Calcium-Paradoxon“ bezeichnet. Neben der intrazellulären wirkt sich auch die extrazelluläre Calcium-Konzentration auf die Reninsekretionsrate aus. So wurde bei mehreren Versuche an isolierten Nieren, isolierten Glomeruli, einzelnen Nierenschnitten und isolierten JG-Zellen, bei denen die extazelluläre Calcium-Konzentration gesenkt wurde, eine gesteigerte Reninsekretion in den JG-Zellen beobachtet (Baumbach et al., 1976; Moe et al., 1991; Ortiz-Capisano et al., 2007c; Scholz et al., 1994). Es wird vermutet, dass eine niedrige Calcium-Konzentration und der daraus folgende niedrige transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx zu einem Abfall der zytosolischen Calcium-Konzentration führt (Kurtz und Penner, 1989). Auch ein auf den Reninzellen exprimierter „calcium sensing“-Rezeptor (CaSR) scheint an der Regulation der Reninsekretion durch die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt zu sein (Maillard et al., 2009; Ortiz-Capisano et al., 2007a). Es wird zurzeit noch untersucht, inwiefern eine hohe zytosolische Calcium-Konzentration zu einer Hemmung der Reninsekretion führt. Die genauen intrazellulären Signalwege sind, genau wie bei cAMP, noch nicht bekannt. Möglicherweise spielen jedoch die bereits erwähnten Adenylatcyclasen AC-5 und AC-6 eine Rolle. Diese Adenylatcyclasen werden durch eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gehemmt, was wiederum zu einer niedrigen intrazellulären cAMP-Konzentration führt und somit sekretionshemmend wirkt (Grunberger et al.,

2006; Ortiz-Capisano et al., 2007c). Versuche mit Primärkulturen von JG-Zellen, die ein inverses Verhältnis von cytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentration zeigten, scheinen diese Vermutung zu bestätigen (Grunberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007a; Ortiz-Capisano et al., 2007c). Weitere calciumabhängige Signalwege wirken vermutlich über Calmodulin oder die Proteinkinase C (Hackenthal et al., 1990; Kurtz, 1989; Schweda und Kurtz, 2004).

### **2.3.2.3. Zyklisches GMP und der cGMP-Signalweg**

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Reninsekretion in JG-Zellen auswirkt, ist die intrazelluläre Konzentration an zyklischem GMP (cGMP). Im Gegensatz zu cAMP, welches die Reninsekretion stimuliert, kann cGMP sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Versuche mit Hormonen, die die cGMP-Konzentration in JG-Zellen beeinflussen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), zu widersprüchlichen Ergebnissen führen (Kurtz und Wagner, 1998). Bei genaueren Untersuchungen zeigt sich ein biphasischer Effekt. Niedrigere cGMP-Konzentrationen scheinen die Reninsekretion zu stimulieren, während diese durch höhere Konzentrationen gehemmt wird. Der genaue Signalweg ist noch unbekannt und wird zurzeit kontrovers diskutiert, jedoch scheinen niedrigere cGMP-Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die bereits erwähnte Phosphodiesterase 3 (PDE-3) auszuüben, was zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und einer gesteigerten Reninsekretion führt (Kurtz et al., 1988a; Kurtz et al., 1986b; Kurtz et al., 1998a; Kurtz et al., 1998b; Kurtz und Wagner, 1998). Dieses Zusammenspiel von cAMP- und cGMP-Signalweg wurde in vivo und in patch-clamp Experimenten an einzelnen JG-Zellen bestätigt (Beierwaltes, 2006; Friis et al., 2002). Höhere cGMP-Konzentrationen scheinen die vesikelassoziierte cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII) zu inhibieren, was wiederum über einen bisher unbekannten Mechanismus die Reninsekretion hemmt (Gambaryan et al., 1998; Wagner et al., 1998). Es ist anzunehmen, dass der stimulierende und inhibierende cGMP-Signalweg räumlich voneinander getrennt sind. Die von NO aktivierte lösliche Guanylatcyclase (sGC) ist, genau wie die PDE-3, im Zytosol lokalisiert. Das von der sGC produzierte cGMP könnte diese also hemmen, was die stimulierende Wirkung von NO auf die Reninsekretion erklären würde. Im Gegensatz dazu existiert eine membrangebundene Guanylatcyclase (pGC), welche sich

in der Nähe der vesikelassoziierten cGKII befindet und von ANP aktiviert wird. Das von der pGC produzierte cGMP könnte folglich die cGKII und damit die Reninsekretion hemmen, was die hemmende Wirkung von ANP erklären würde. Eine räumliche Abhängigkeit der durch ANP und NO induzierten cGMP-Signale wurde bereits in HEK-Zellen und Glattmuskelzellen (VSMC), nicht aber in JG-Zellen nachgewiesen (Nausch et al., 2008; Piggott et al., 2006).

## **2.4. Sekretionsmechanismen**

Der Transport von sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran eukaryotischer Zellen ist sowohl essentiell für eine normale Zellfunktion als auch die Voraussetzung für die interzelluläre Kommunikation durch extrazellulär wirkende Signalmoleküle. In fast allen Zellen fusionieren die Vesikel über einen sogenannten „konstitutiven“ Exozytosemechanismus, der dazu dient, neues Membranmaterial in die Zellmembran einzubringen und in manchen Fällen extrazelluläre Moleküle, wie z.B. Plasmaproteine, Antikörper und Komponenten der extrazellulären Matrix freizusetzen (Burgess und Kelly, 1987; Kelly, 1985). In vielen Zelltypen existiert ein weiterer Exozytoseweg, der in den meisten Fällen stark reguliert wird. Dieser regulierte Exozytosemechanismus erlaubt die kontrollierte Freisetzung des Vesikelinhalts und den regulierten Einbau von Membrankomponenten in die Zellmembran in Antwort auf ein definiertes physiologisches Signal. In Synapsen stellt die regulierte Exozytose den Primärmechanismus für eine sehr schnelle Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln und Dense-Core-Vesikeln (DCV) dar und ist schon seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Studien (Bean et al., 1994; Kelly, 1993; Thureson-Klein, 1983; Zucker, 1996). Auch viele endo- und exokrine Zellen sezernieren ihre in Vesikeln gespeicherten sekretorischen Produkte mittels regulierter Exozytose. In den letzten Jahren wurden hierzu vor allem die Chromaffinzellen der Nebenniere (Burgoyne und Morgan, 1998a; Morgan und Burgoyne, 1997), die  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Easom, 2000; Lang, 1999) und hämatopoietische Zellen, wie z.B. Mastzellen (Lindau und Gomperts, 1991), untersucht. Auch die endokrinen juxtaglomerulären Epitheloidzellen der Niere setzen das in ihren „Dense-Core“ Vesikeln (DCV) gespeicherte Renin über einen regulierten Exozytosemechanismus frei, der im Einzelnen jedoch noch nicht

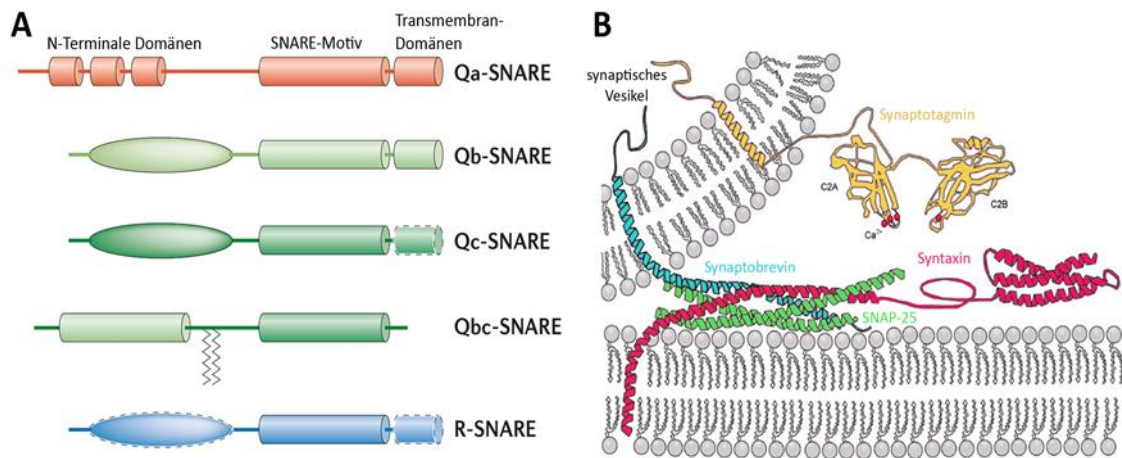
verstanden ist (Friis et al., 2000; Hackenthal et al., 1990; Ogawa et al., 1995; Skott, 1986; Taugner et al., 1984a). Im Folgenden werden einige mögliche Freisetzungsmechanismen vorgestellt.

### **2.4.1. Der klassische regulierte Sekretionsmechanismus**

#### **2.4.1.1 SNARE-Proteine und der SNARE-Komplex**

Bereits vor mehr als 20 Jahren wurden lösliche Faktoren entdeckt, die für die Vesikelfusion in tierischen Zellen benötigt werden. Diese wurden als N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) und  $\alpha, \beta, \gamma$ -soluble NSF acceptor proteins ( $\alpha, \beta, \gamma$ -SNAPs) bezeichnet (Clary et al., 1990; Malhotra et al., 1988; Wilson et al., 1989). Desweiteren wurden neuronale Membranproteine identifiziert, die ATP-abhängig sowohl an NSF als auch an SNAPs binden. Diese sogenannten SNAP-receptors (SNAREs) wurden als SNAP-25, Synaptobrevin/VAMP2 und Syntaxin bezeichnet (Sollner et al., 1993a). Weitere wichtige Meilensteine bei der Aufklärung des Mechanismus der Membranfusion waren die Entdeckung, dass in gegenüberliegenden für die Fusion bestimmten Membranen verschiedene SNARE-Sets existieren, und dass diese SNAREs miteinander einen sogenannten SNARE-Komplex bilden können, welcher die Membranfusion antreibt (Fasshauer, 2003; Nichols et al., 1997). Desweiteren wurde entdeckt, dass manche SNAREs nur in bestimmten zellulären Kompartimenten existieren. Jede Membran besitzt also ein spezifisches SNARE-Set (Hong, 2005). Die SNAREs wurden entsprechend ihrer Lokalisation zuerst in sogenannte v-SNAREs (vesicle membrane SNAREs) und t-SNAREs (target membrane SNAREs) eingeteilt (Sollner et al., 1993b). Später, einhergehend mit dem genaueren Verständnis des molekularen Aufbaus der SNAREs, setzte sich die Klassifizierung in Qa-, Qb-, Qc- und R-SNAREs durch (Bock et al., 2001; Fasshauer et al., 1998a). Der Aufbau der SNARE-Proteine ist relativ einfach (Abb. 2A). Sie bestehen aus einem sogenannten SNARE-Motiv, eine  $\alpha$ -Helix welche essentiell für die Ausbildung des SNARE-Komplexes ist und entweder einen stark konservierten Glutamin(Q)-Rest oder einen Arginin(R)-Rest beinhaltet und aus einer N-terminalen Domäne, an die andere am SNARE-Komplex beteiligte Proteine binden können (Dietrich et al., 2003; Misura et al., 2002). Die membrangebundenen SNAREs besitzen zusätzlich dazu eine Transmembrandomäne.

Eine Ausnahme bilden SNAP-25 und dazu homologe Proteine, welche zwei  $\alpha$ -Helices und keine Transmembrandomäne beinhalten und als Qbc-SNAREs bezeichnet werden.



**Abb. 2: Struktur von SNAREs.**

**A:** Struktur der SNARE-Subfamilien. Die n-terminalen Domänen der Qb-, Qc- und R-SNAREs sind als Oval dargestellt. Gestrichelte Linien heben Domänen hervor, die in einigen Subfamilien fehlen können (nach Jahn und Scheller, 2006). **B:** Der synaptische SNARE-Komplex besteht aus einem 4-Helix-Bündel. Syntaxin steuert eine Q-Helix, SNAP-25 zwei Q-Helices und Synaptobrevin 2 (VAMP2) eine R-Helix zu diesem Helixbündel bei. Das in der Vesikelmembran verankerte Synaptotagmin unterstützt die Bildung des SNARE-Komplexes in calciumabhängiger Weise (nach Chapman, 2002).

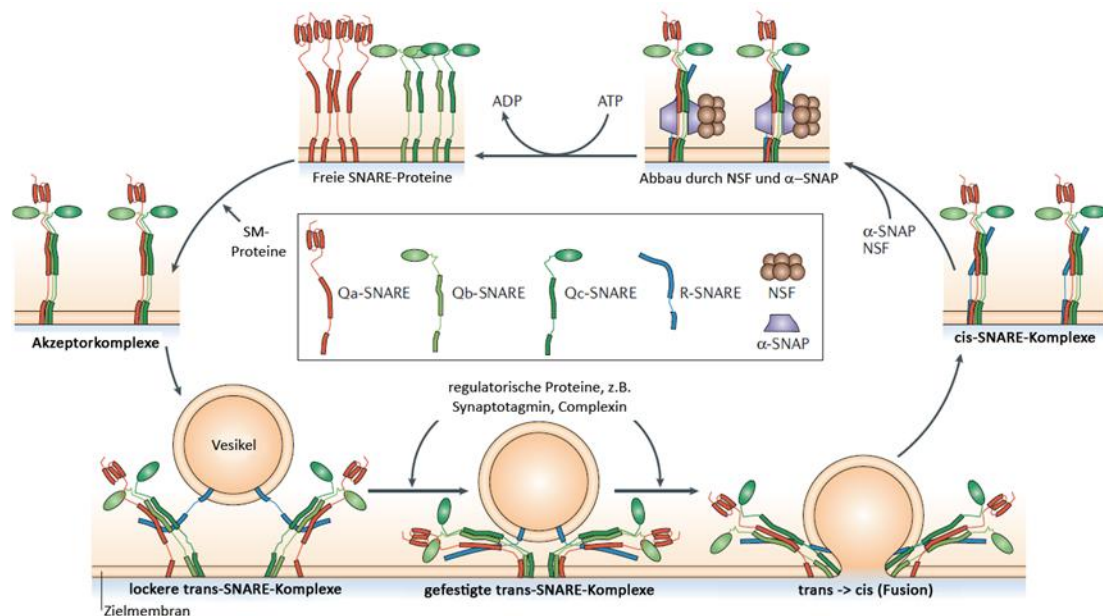
Q-SNAREs sind meistens an der Zielfmembran gebunden, während R-SNAREs an der Vesikelmembran lokalisiert sind. Die SNARE-Proteine auf den gegenüberliegenden Membranen bilden ein 4-Helix-Bündel, bestehend aus den  $\alpha$ -Helices ihrer SNARE-Motive. Die bei der Bildung dieses SNARE-Komplexes freiwerdende Energie treibt die Membranfusion an (Fasshauer, 2003; Fasshauer et al., 1998b). SNARE-Komplexe beinhalten immer drei Q-Helices (v-SNAREs) und eine R-Helix (t-SNARE) (Fasshauer et al., 1998a). Beispielsweise wird der synaptische SNARE-Komplex von Syntaxin (t-SNARE, eine Q-Helix), SNAP-25 (t-SNARE, zwei Q-Helices) und VAMP 2 (v-SNARE, eine R-Helix) gebildet (Poirier et al., 1998; Sutton et al., 1998) (Abb. 2B). Dieses 3Q:1R-Verhältnis nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und das Vorhandensein von spezifischen SNARE-Sets in den unterschiedlichen Zellkompartimenten erlaubt spezifische SNARE-Paarungen und ermöglicht damit die Membranfusion nur zwischen zwei dafür vorgesehenen Membranen (Hong, 2005; McNew et al., 2000; Parlanti et al., 2000).

#### 2.4.1.2. Der SNARE-Zyklus

Wie bereits erwähnt, durchlaufen die auf Vesikel- und Zielfmembran lokalisierten SNARE-Proteine einen Zyklus von Konformationsänderungen und gegenseitigen Wechselwirkungen, die letztendlich zur Fusion der beiden Membranen führen (Abb. 3).



Detaillierte Studien an *S. cerevisiae* und neuronalen SNARE-Komplexen zeigten, dass dieser SNARE-Zyklus mit der Bildung eines sogenannten Akzeptor-Komplexes aus den auf der Zielmembran gelegenen Qa-, Qb, und Qc-SNAREs startet (Fasshauer und Margittai, 2004; Fiebig et al., 1999; Nicholson et al., 1998). Dieser Qabc-Komplex wird

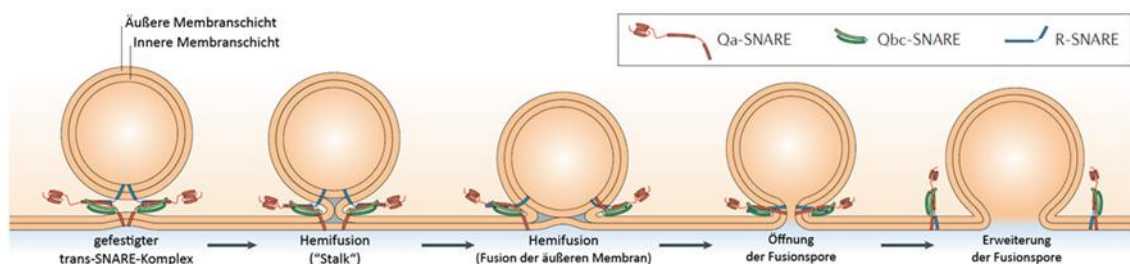


**Abb. 3: Der SNARE-Zyklus.**

Beispielhaft werden drei Q-SNAREs auf der Zielmembran und ein R-SNARE auf der Vesikelmembran dargestellt. Q-SNAREs sind in Clustern organisiert und formieren sich zu Akzeptorkomplexen, wofür S/M-Proteine benötigt werden. Akzeptorkomplexe interagieren mit R-SNAREs, was zur Bildung von lockeren trans-SNARE-Komplexen führt. Regulatorische Proteine kontrollieren die Konformationsänderung zum gefestigten trans-SNARE-Komplex und schließlich zum cis-SNARE-Komplex, was die Membranfusion auslöst. Anschließend werden die cis-SNARE-Komplexe durch NSF unter Beteiligung von  $\alpha$ -SNAP abgebaut (nach Jahn und Scheller, 2006)

auf bisher unbekannte Weise von S/M-Proteinen (sec1/munc18 related proteins) stabilisiert, die an den N-terminalen Domänen der SNAREs, z.B. an die Habc-Domäne von Syntaxin binden (Dulubova et al., 2007; Jahn, 2000; Shen et al., 2007). Nähert sich nun die Vesikelmembran mit den assoziierten R-SNAREs dem Qabc-Komplex auf der Zielmembran, so bilden die SNAREs zuerst einen lockeren trans-SNARE-Komplex durch Aneinanderlagerung ihrer  $\alpha$ -Helices. Im trans-SNARE-Komplex sind zuerst nur die N-terminalen Enden der Helices assoziiert. Obwohl trans-SNARE-Komplexe im Allgemeinen als notwendige Intermediärprodukte der Vesikelfusion gelten, gibt es bisher nur indirekte Beweise für ihre Existenz (Borisovska et al., 2005; Sorensen, 2004). Wie jedes Intermediärprodukt des SNARE-Zyklus kann der trans-SNARE-Komplex durch andere Proteine reguliert werden. Beispielsweise ist bei synaptischen Exozytosevorgängen Synaptotagmin I, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Transmembranprotein, welches zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende C2-Domänen besitzt, essentiell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fusion der

Vesikel (Chapman, 2002; Sudhof, 2004). In Säugetieren wurden bisher 14 verschiedene Synaptotagmine entdeckt, was darauf hindeutet, dass diese generell bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation von Exozytosevorgängen eine wichtige Rolle spielen (Sudhof, 2002). Desweiteren wirken auch die Complexine, lösliche 15kDa große Proteine, als regulatorische Faktoren, indem sie an bereits gebildete SNARE-Komplexe binden und diese stabilisieren (Archer et al., 2002; Chen et al., 2002). Beeinflusst und stabilisiert durch regulatorische Proteine kommt es nun zum „ Reißverschlussartigen“ Aneinanderlagern der  $\alpha$ -Helices der SNAREs, ausgehend von ihren N-terminalen Enden. Es bildet sich ein stabiler trans-SNARE-Komplex. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung des SNARE-Komplexes vom trans- in den cis-Zustand. Im Zuge dieser Konformationsänderung bildet sich eine Fusionspore und die Vesikelmembran fusioniert mit der Zielmembran. Die genauen physikalischen Vorgänge, die zur Fusion der Membran führen, sind noch unklar. Der „Stalk“-Theorie nach üben die SNARE-Komplexe eine mechanische Kraft auf die biegsamen Membranen aus, was zuerst zur Fusion der äußeren und dann der inneren Phospholipidschichten der Membranen



**Abb. 4: Hypothetische Übergangsstadien der SNARE-vermittelten Membranfusion nach der „Stalk“-Theorie.**  
(nach Jahn und Scheller, 2006)

führt (Abb. 4) (Chernomordik und Kozlov, 2003; Jahn und Grubmüller, 2002). Neueren Studien zufolge sind 3-15 SNARE-Komplexe für die Ausbildung einer Fusionspore notwendig (Montecucco et al., 2005). Nach Abschluss der Membranfusion wird der cis-SNARE-Komplex vom bereits erwähnten NSF, einem hexameren Mitglied der AAA+-Proteinfamilie, unter ATP-Verbrauch in seine Einzelkomponenten zerlegt (Sollner et al., 1993a). Dazu werden SNAP-Proteine als Kofaktoren benötigt, die zuerst am cis-SNARE-Komplex binden müssen. Der genaue Arbeitsweise von NSF ist jedoch noch unbekannt (Marz et al., 2003). Die freiwerdenden Q- und R-SNAREs werden daraufhin durch intrazelluläre Sortiervorgänge in ihre jeweiligen Donor-Kompartimente zurücktransportiert. Es ist noch unklar, welche Sortiersignale für den korrekten Rücktransport

verantwortlich sind, jedoch scheinen weniger eine definierte Signalsequenz als vielmehr die zytoplasmatischen N-terminalen Domänen der SNAREs dafür von essentieller Bedeutung zu sein (Grote et al., 1995; West et al., 1997; Zeng et al., 2003). Die SNARE-Proteine sind daraufhin bereit für einen weiteren SNARE-Zyklus.

#### **2.4.1.3. Rab-Proteine und Rab-Effektoren**

Abgesehen von den SNAREs selbst, spielen Rab-Proteine eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Spezifität des Kontakts von Vesikel und Ziellmembran. Diese Proteine stellen mit 60 Isoformen beim Menschen die größte Familie innerhalb der Superfamilie der kleinen Ras-GTPasen dar (Bock et al., 2001; Pereira-Leal und Seabra, 2001). Genau wie andere monomere Ras-ähnliche GTPasen, funktionieren Rabs als molekulare Schalter, indem sie zwischen zwei Zuständen, einem GDP-gebundenen inaktiven und einem GTP-gebundenen aktiven Zustand umschalten. Dieser Wechsel wird durch zwei regulatorische Proteine kontrolliert, dem guanine nucleotide exchange factor (GEF) und dem GTPase-activating protein (GAP). Die GTP-gebundene aktive Isoform der Rabs wird zu Transportvesikeln und Organellen rekrutiert und ist verantwortlich für den Vesikeltransport und die Fusion des Vesikels mit der korrekten Ziellmembran, indem es mit spezifischen Effektorproteinen auf der Ziellmembran, den sogenannten Rab-Effektoren, interagiert (Pfeffer, 2001; Segev, 2001; Zerial und McBride, 2001). Bei der regulierten Exozytose von synaptischen und anderen sekretorischen Vesikeln scheinen insbesondere Rab3 (A/B/C/D) und Rab27 (A/B) von übergeordneter Bedeutung zu sein, da diese Isoformen auf einer Vielzahl von Vesikeln, einschließlich neuronalen, endo- und exokrinen und sekretorischen Vesikeln von Immunzellen gefunden wurden (Fukuda, 2005; Geppert und Sudhof, 1998; Gomi et al., 2007; Takai et al., 1996; Tolmachova et al., 2004). Desweiteren weisen sowohl Rab3- als auch Rab27 Knockout Tiere eindeutige Sekretionsdefekte auf (Gomi et al., 2007; Mizuno et al., 2007; Schluter et al., 2006). Die genaue Wirkungsweise der Rab-Proteine ist noch nicht eindeutig aufgeklärt, sie scheinen jedoch für die Rekrutierung und das Docking der sekretorischen Vesikel an die Plasmamembran der Zelle vor der Ausbildung des SNARE-Komplexes verantwortlich zu sein (Kasai et al., 2005; Tsuboi und Fukuda, 2006) indem sie dort an spezielle Rab-Effektoren, z.B. Granuphilin, Rabphilin, Noc2 und Slp4-a binden (Coppola et al., 2002; Fukuda, 2003; Fukuda et al., 2004).

#### **2.4.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine**

Die nahezu universale Rolle von Calcium als der Auslöser der Exozytose von Vesikeln lässt auf die Existenz von Proteinen schließen, welche die Fusionsmaschinerie bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung aktivieren. Obwohl dafür mehrere mögliche Proteine infrage kamen, stellte sich das bereits erwähnte Synaptotagmin als einer der wahrscheinlichsten Kandidaten für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor der regulierten Exozytose in Synapsen heraus (Brose et al., 1992; Burgoyne und Morgan, 1998b). Alle 13 Isoformen des Proteins besitzen zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende  $\text{C}_2$ -Domänen,  $\text{C}_2\text{A}$  und  $\text{C}_2\text{B}$ , gefolgt von einer variablen Verbindungssequenz und einem Membrananker, mit dem das Protein in der Vesikelmembran verankert ist (Abb. 2B)(Perin et al., 1991; Perin et al., 1990). Es wurde zudem gezeigt, dass Synaptotagmin mit vielen an der Vesikelexozytose beteiligten Proteinen wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, dem SNARE-Komplex und  $\beta$ -SNAP interagiert (Leveque et al., 1992; Schiavo et al., 1995; Sollner et al., 1993a). Neuere Studien zeigten, dass Synaptotagmin auch bei nichtneuronalen Sekretionsvorgängen eine wichtige Rolle spielt. So ist beispielsweise Synaptotagmin an der Freisetzung von Insulin, Synaptotagmin VII an der Exozytose von Lysosomen und Synaptotagmin I und II an der Degranulation von Basophilen beteiligt (Baram et al., 1999; Baram et al., 1998; Gut et al., 2001; Martinez et al., 2000). Die genaue Wirkungsweise von Synaptotagmin ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass das auf der Vesikelmembran vorliegende Synaptotagmin fünf  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die  $\text{C}_2\text{A}$ - und  $\text{C}_2\text{B}$ -Domänen bindet, und diese  $\text{C}_2$ -Domänen daraufhin mit der Zielmembran interagieren, so dass die beiden Membranen sich nähern und die Membranfusion durch die direkte Gegenüberstellung der SNARE-Proteine und der damit einhergehenden erleichterten Bildung eines SNARE-Komplexes eingeleitet wird (Chen et al., 1999; Hu et al., 2002). Zudem bindet Synaptotagmin auf Calcium-unabhängige Weise an Syntaxin I und SNAP-25 und löst Konformationsänderungen aus, welche die Aneinanderlagerung der SNAREs erleichtern (Chapman et al., 1995; Matos et al., 2000; Melia et al., 2002). Weitere, aller Wahrscheinlichkeit nach an Vesikelexozytose beteiligte Calcium-bindende Proteine, sind Rabphilin3A und Calmodulin. Die genauen Wirkungsweisen dieser Proteine sind noch unbekannt. Das lösliche Rabphilin3A besitzt, genau wie Synaptotagmin, zwei Calcium-bindende  $\text{C}_2$ -Domänen, während Calmodulin Calcium mittels vier EF-Hand-Motiven bindet (Shirataki et al., 1993; Steinhardt und Alderton, 1982).

### **2.4.2. Der „Kiss-and-Run“-Mechanismus**

Bereits vor fast 40 Jahren wurde postuliert, dass die Freisetzung von Neurotransmittern aus einem synaptischen Vesikel sehr schnell und ohne die Notwendigkeit einer kompletten Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran vonstattengehen kann. Stattdessen kommt es nur zu einer kurzen vorübergehenden Öffnung der Fusionspore (Ceccarelli et al., 1973). Dieser Vorgang wurde später als “kiss and run“-Mechanismus bezeichnet (Fesce et al., 1994). Neuere Studien zeigen, dass dieser Mechanismus nicht nur von synaptischen Vesikeln sondern auch von sekretorischen Vesikeln endokriner Zellen, beispielsweise von Insulin sezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas oder von adrenalen Chromaffinzellen, angewendet werden kann (Elhamdani et al., 2006; Tsuboi et al., 2004). Der grundlegende Mechanismus ist identisch mit dem der klassischen Exozytose, d.h. er ist SNARE-vermittelt. Der genaue Mechanismus welcher zur Schließung der Fusionspore führt ist jedoch noch unklar. Einer Theorie zufolge könnte dieselbe Maschinerie, die für die Abspaltung und Rückgewinnung Clathrin-beschichteter endozytotischer Vesikel mit Hilfe des Enzyms Dynamin verantwortlich ist, auch bei der Abschnürung der Fusionspore eine Rolle spielen (Artalejo et al., 1995; Sever et al., 2000). Das Vorhandensein von Dynamin auf sekretorischen Vesikeln von Chromaffinzellen scheint diese Theorie zu unterstützen (Galas et al., 2000).

### **2.4.3. Die regulierte lysosomale Sekretion**

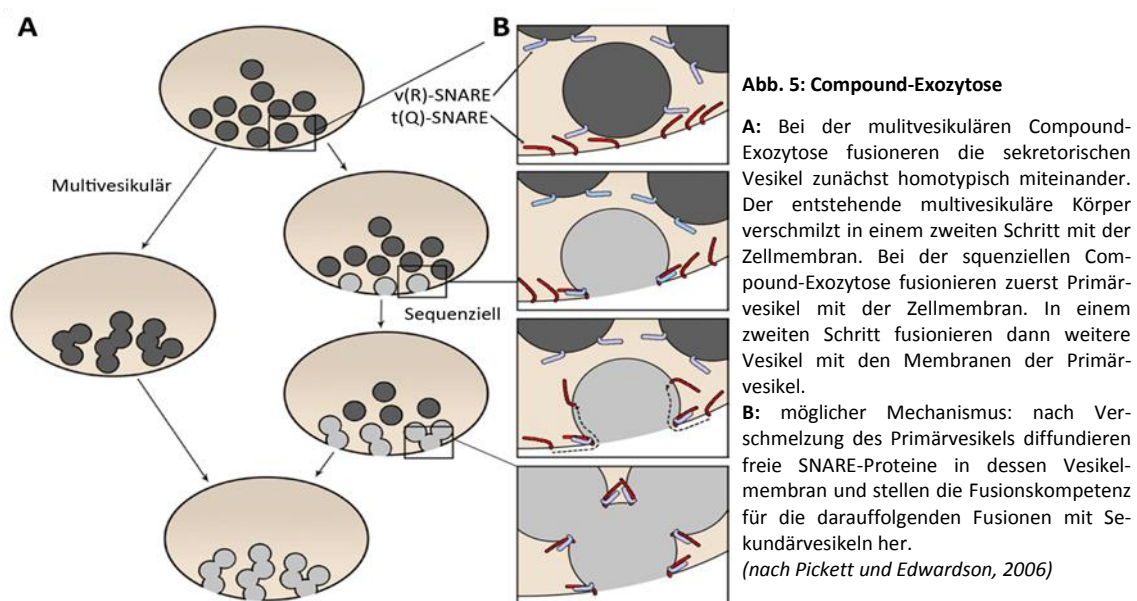
Anders als bei den meisten Zellen, die ihre sekretorischen Produkte in sekretorischen Vesikeln speichern, erfüllt diese Aufgabe in einigen wenigen Zellen ein verändertes lysosomales Kompartiment, welches als sekretorisches Lysosom (SL) bezeichnet wird. Zu diesen Zellen zählen unter anderem Melanozyten und viele Zellen hämatopoietischen Ursprungs, wie beispielsweise zytotoxische T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Mastzellen (Marks und Seabra, 2001; Marone et al., 1997; Peters et al., 1991a; Peters et al., 1991b). Desweiteren deuten viele Studien daraufhin, dass auch die JG-Zellen der Niere Renin in SLs speichern. So sind sowohl die Renin enthaltenden sekretorischen Vesikel als auch die SLs in Melanozyten und hämatopoietischen Zellen

der Beige (LYST  $-/-$ ) Maus abnormal vergrößert (Jensen et al., 1997b; Ozaki et al., 1994). Bei diesem Knockout ist das LYST-Protein (lysosomal trafficking protein) deletiert, welches an der korrekten Ausbildung von Lysosomen und der Abschnürung von Lysosomenmembranen beteiligt ist. Außerdem wurden bereits mehrere lysosomenspezifische Proteasen in den Reninvesikeln nachgewiesen (Soltesz et al., 1979; Taugner et al., 1985). Sowohl normale als auch sekretorische Lysosomen besitzen spezifische Membranproteine, sogenannte LIMPs (lysosome integral membrane proteins) und LAMPs (lysosome associated membrane proteins). Desweiteren besitzen sie einen sauren pH und enthalten lysosomale Proteine (z.B. Hydrolasen). Anders als in normalen Lysosomen sind in SLs zusätzliche Komponenten gespeichert, die durch eine Fusion mit der Zellmembran sezerniert werden können (Dell'Angelica et al., 2000; Griffiths, 1996). Die Exozytose von SLs ist wie bei anderen sekretorischen Vorgängen SNARE-vermittelt. Es wurde bereits eine Vielzahl von mit sekretorischen Lysosomen assoziierten SNAREs gefunden, beispielsweise SNAP-23, VAMP 2 und VAMP 7 in Mastzellen (Guo et al., 1998; Hibi et al., 2000; Paumet et al., 2000) und Syntaxin 3, Syntaxin 4 und VAMP 2 in Neutrophilen (Brumell et al., 1995). Desweiteren scheinen Synaptotagmine eine wichtige Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Exozytose von SLs zu sein (Martinez et al., 2000). Genau wie bei sekretorischen und synaptischen Vesikeln sind Rabs, insbesondere Rab27a und Rab37 für die Spezifität der Membranfusion von SLs und Ziellmembran verantwortlich (Jager et al., 2000; Pastural et al., 2000). Die genaue Rolle der SNAREs und Rabs bei der Exozytose von SLs ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt.

#### **2.4.4. Der Compound-Exozytose-Mechanismus**

Wie bereits erwähnt, versteht man unter regulierter Exozytose das durch ein Signal ausgelöste Verschmelzen von Vesikel- und Zellmembran. In einigen Zellen, beispielsweise den meisten neuronalen Zellen, interagiert jedes Vesikel individuell mit der Zellmembran. Nach der Öffnung der Fusionspore kollabiert die Vesikelmembran in die präsynaptische Plasmamembran, oder die Fusionspore schließt sich, ein Prozess der bereits als „kiss-and-run“-Mechanismus beschrieben wurde. In anderen Zellen interagieren die sekretorischen Vesikel jedoch während der Fusion untereinander.

Dieser Vorgang wird als Compound-Exozytose (CE) bezeichnet, wobei zwischen zwei Unterarten unterschieden wird. Bei der sequenziellen CE verschmelzen zuerst sogenannte Primärvesikel mit der Plasmamembran. Diese Primärvesikel stellen dann das Ziel einer Fusion mit tiefer im Zellinneren gelegenen Sekundärvesikeln dar (Abb. 5A/B) (Ichikawa, 1965; Nemoto et al., 2001). Im Gegensatz dazu verschmelzen bei der sogenannten multivesikulären CE die sekretorischen Vesikel zuerst homotypisch miteinander. Die entstehenden multivesikulären Körper fusionieren daraufhin mit der Zellmembran (Abb. 5A) (Alvarez de Toledo und Fernandez, 1990). Sowohl sequentielle als auch multivesikuläre CE wurde in vielen Zellarten, darunter Azinus- und  $\beta$ -Zellen des Pankreas, Mastzellen, Eosinophile und Neutrophile, nachgewiesen, wobei diese zwei Unterarten in einer Zellart auch parallel auftreten können (Bokvist et al., 2000; Hafez et al., 2003; Hartmann et al., 2003; Lollike et al., 2002; Sceppek und Lindau, 1993). Es hat den Anschein, dass der Compound-Mechanismus in diesen Zellen primär dazu dient, den Ausstoß von sekretorischen Produkten in einem gewissen Zeitraum zu



maximieren (Pickett und Edwardson, 2006). Bisher ist noch unklar, wie der zeitliche Ablauf der Fusionen bei sequentieller und multivesikulärer CE reguliert ist. Bei der sequentiellen CE erhalten die Sekundärvesikel erst nach der Fusion von Primärvesikeln mit der Zellmembran die Fusionskompetenz, die sie benötigen um mit den Primärvesikeln zu verschmelzen. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist noch größtenteils unverstanden. Auf Vesikeln von Azinuszellen wurden einige SNARE-Proteine, darunter Syntaxin 2, Synaptobrevin 2 (VAMP 2) und Endobrevin (VAMP 8)

gefunden (Gaisano et al., 1996; Hansen et al., 1999; Wang et al., 2004). Einer Theorie zufolge wandern SNARE-Proteine nach der Primärfusion in die Membranen der Primärvesikel und stellen die Fusionskompetenz für die Sekundärvesikel her (Abb. 5B) (Pickett und Edwardson, 2006). Die Diffusion von SNAREs in Primärvesikel wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen (Pickett et al., 2007; Takahashi et al., 2004). Dies liefert jedoch keine Aussagekraft über deren Rolle bei der Vesikelfunktion. Neuste Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass die Primär- und Sekundärfusion von unterschiedlichen SNARE-Komplexen, bestehend aus differierenden SNARE-Sets, eingeleitet wird. An der Regulation der zeitlichen Abfolge scheinen S/M-Proteine, SNAP-23 oder andere Faktoren, wie beispielsweise eine pH-Änderung der Vesikel, beteiligt zu sein (Thorn und Gaisano, 2012). Desweiteren wird Endobrevin (VAMP 8) angeblich speziell bei der Fusion von Vesikeln untereinander, jedoch nicht bei der Primärfusion benötigt (Behrendorff et al., 2011). Bei der multivesikulären CE müssen die sekretorischen Vesikel zuerst homotypisch miteinander fusionieren. Die entstehenden multivesikulären Körper verschmelzen dann in einem zweiten Schritt SNARE-vermittelt mit der Zellmembran. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, es wurde jedoch postuliert, dass die multivesikulären Körper bereits lange vor der Fusion mit der Zellmembran gebildet werden. Desweiteren gibt es Hinweise, dass eine Fusion der sekretorischen Vesikel untereinander durch die Fusion einzelner Vesikel mit der Zellmembran ausgelöst wird. Dies würde bedeuten, dass sich die multivesikuläre CE in biochemischem Sinne nicht von der sequentiellen CE unterscheidet (Alvarez de Toledo und Fernandez, 1990; Pickett und Edwardson, 2006).

## **2.5. Zielsetzung**

Die Protease Renin dient als zentraler regulatorischer Faktor des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems. Es wird zum größten Teil von den juxtaglomerulären Epitheloidzellen der Niere produziert und in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Die Freisetzung von Renin wird durch den cAMP-Signalweg stimuliert und durch eine hohe intra- und extrazelluläre Konzentration von Calcium-Ionen inhibiert. Der genaue Freisetzungsmechanismus von Renin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. So ist die Inhibierung durch Calcium sehr ungewöhnlich, da Calcium im Allgemeinen als



essentiell für die Induzierung und Aufrechterhaltung von sekretorischen Ereignissen angesehen wird. Desweiteren wurden morphologische Anzeichen von Exozytosen, wie beispielsweise Omega-Strukturen, im Gegensatz zu den sehr auffälligen und zahlreich vorhandenen Reninspeichervesikeln nur äußerst selten in reninproduzierenden Zellen beobachtet. Darüber hinaus weisen diese Vesikel auf elektronenmikroskopischer Ebene betrachtet eine irreguläre, nicht runde Form auf. Andere Faktoren, wie beispielsweise die Quantum-artige Freisetzung von Renin, der Anstieg der Membrankapazität und das Verschwinden der Reninspeichervesikel bei dieser Freisetzung deuten jedoch auf eine Reninsekretion durch einen klassischen regulierten Exozytosemechanismus hin. Es bleiben demzufolge noch viele Fragen bezüglich des genauen Mechanismus der Reninsekretion offen. Ziel dieser Arbeit ist es, ein tieferes zellbiologisches Verständnis des Freisetzungsvorgangs von Renin und seiner Regelung zu erhalten. Zu diesem Zweck soll mittels dreidimensionaler Rekonstruktion von Teilausschnitten von Reninzellen untersucht werden, ob die Reninfreisetzung primär über die Fusion einzelner Vesikel mit der Plasmamembran (Exozytose) oder durch intrazelluläre Fusion von Vesikeln zu einem röhrenförmigen Zisternennetzwerk verläuft. Es soll desweiteren untersucht werden, inwiefern sich die Morphologie der Reninspeichervesikel und die Anzahl der Exozytoseereignisse bei einer Stimulation der Reninsekretion verändert. Zu diesem Zweck sollen mittels 3-dimensionaler Rekonstruktion JG-Zellen von Nieren untersucht werden, deren Reninsekretionsrate entweder mit Isoproterenol, also durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, oder mit EGTA, also durch eine Erhöhung des extrazellulären Calcium-Spiegels, oder durch eine Kombination dieser beiden Agenzien stimuliert wurde. Darüber hinaus sollen JG-Zellen von LYST Knockout (Beige) Mäusen, bei denen eine anormale Form der Reninvesikel bereits auf 2-dimensionaler Ebene beobachtet wurde, und Ren-1 Knockout Mäusen, bei denen nur noch konstitutiv sezerniertes Renin produziert wird, in unstimuliertem und stimuliertem Zustand untersucht werden, da bei diesen Genotypen eine Veränderung der Vesikelmorphologie wahrscheinlich ist. Sowohl der klassische Exozytoseprozess als auch die intrazelluläre Vesikelfusion erfordern spezifische Fusionsproteine. Nachdem über das Vorhandensein dieser SNARE-, Sec/Munc- und Rab-Proteine in reninbildenden Zellen nichts bekannt ist, soll das Expressionsmuster dieser Proteine in diesen Zellen mittels Immunolokalisation

untersucht werden, wobei als Vergleich klassische und atypische endo- und exokrine Zellen herangezogen werden.

## **3. Material und Methoden**

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
<b>Autoklav</b>	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
<b>Computer</b>	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
<b>Eismaschine</b>	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
<b>Filtersets</b>	
<b>TRITC-Filter:</b> Anregung 533-558nm Emission 570-640nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
<b>Cy2-Filter:</b> Anregung 450-490nm Emission 500-550nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
<b>Cy5-Filter:</b> Anregung 625-655nm Emission 665-715nm	Filter set 50, Zeiss, Jena
<b>Fluoreszenzlampe</b>	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
<b>Grafikkarte</b>	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
<b>Homogenisator</b>	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
<b>Inkubationsschrank</b>	Modell B6200, Heraeus, Hanau
<b>Isotec Druckmesser</b>	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
<b>Kameras</b>	AxioCam MRm, Zeiss, Jena TEM-1000, TVIPS-Tietz, Gauting
<b>Magnetrührer</b>	MR 80, Heidolph, Schwabach
<b>Mikroskope</b>	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena Phillips CM12 TEM, Fei & Co, Eindhoven, NL
<b>Mikrotome</b>	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar EM UC7, Leica, Wetzlar CM 3050 S, Leica, Wetzlar

Gerät	Hersteller
MilliQ Plus Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
Mikrowelle	Leica EM AMW, Leica, Wetzlar
PCR-Geräte	Labcycler, Sensoquest, Göttingen
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Scantisch	Motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Servo-Controller für Perfusion	SCP 704, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Diamantklingen	Diatome, Biel, CH
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Kupfer Grids	G2500C 2mm x 1mm, Plano, Wetzlar
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Nickel Grids	G2500N 2mm x 1mm, Plano, Wetzlar
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht

Produkt	Hersteller
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

### 3.1.3. Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
$\alpha$ -Ketoglutarat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Azure II	Fluka, Neu-Ulm
Bleicitrat Ultrastain II	Leica, Wetzlar
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citratmonohydrat	Merck, Darmstadt
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Epoxy-Einbettungsmittel-Kit	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5U/ $\mu$ l	Promega, Mannheim

Produkt	Hersteller
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin <sup>®</sup> 25000 5 ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoproterenol	Sigma, Deisenhofen
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
KCl	Merck, Darmstadt
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
L-Lactat	Sigma, Deisenhofen
L-Maleat	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O (Borax)	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Natriumcitratdihydrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Nuclease-freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer, 0,5 µg/µl	Promega, Mannheim
OsO <sub>4</sub> 2%	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylhydrazin Hydrochlorid, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> x HCl	Sigma, Deisenhofen
Pioloform FN65 Pulver	Plano, Wetzlar
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RIA-Kit	Byk & DiaSorin, Dietzenbach
Saccharose	Sigma, Deisenhofen

Produkt	Hersteller
Sevofluran SEVOrane	Abbott, Wiesbaden
SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Roche, Mannheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan(TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Tissue-Tek-Einbettmedium	A. Hartenstein, Würzburg
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Vasopressin-8-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

### 3.1.4. Primer

Die Genotypisierungsprimer wurden von der Firma Biomers.net in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Name	Sequenz	Produkt
R/C-Ren1 <sup>d</sup> -S	5'- gaaggagagcaaaaggtaagag-3'	Ren 600bp
R/C- Ren1 <sup>d</sup> -AS	5'-gtagtagaagggggagtgtg-3'	Cre 350bp
R/C-Cre-AS	5'-ttggtgtacggtcagtaaattggac-3'	

### 3.1.5. Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
chicken anti-Renin IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:200
mouse anti-Glattmuskel-aktin-IgG	polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg	1:100
rabbit anti-Calnexin-IgG	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:200
rabbit anti-SNAP23-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
mouse anti-SNAP25-IgG	monoklonal	Hiss Diagnostics, Freiburg	1:200
rabbit anti-RAB 3B-IgG	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:100
sheep anti-RAB 27A-IgG	polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:100



<b>Primärantikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
rabbit anti-VAMP 2-IgG	polyklonal	AG Bruns, Uni Saarland	1:800
rabbit anti-VAMP 3-IgG	polyklonal	AG Bruns, Uni Saarland	1:500
rabbit anti-VAMP 5-IgG	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:200
rabbit anti-VAMP 7-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
rabbit anti-VAMP 8-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
rabbit anti-Synaptotagmin 1-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
rabbit anti-Synaptotagmin 5/9- IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
rabbit anti-Synaptotagmin 7-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
rabbit anti-munc 18-IgG	polyklonal	Calbiochem, Bad Soden	1:200
rabbit anti-LAMP 1-IgG	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:100
rabbit anti-CADPS 2-IgG	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:200
rabbit anti-Syntaxin 2-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
rabbit anti-Syntaxin 4-IgG	polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen	1:200

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
donkey anti-rabbit-IgG	Rhodamin-(TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-chicken-IgY	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-sheep-IgG	Rhodamin-(TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse-IgG	Rhodamin-(TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse-IgG	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-goat-IgG	Rhodamin-(TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-goat-IgG	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400

### 3.1.6. Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien für sämtliche Puffer und Lösungen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst.

#### Immunhistochemie:

##### **Fixierlösung für Perfusion**

PBS	
Paraformaldehyd	3 %

filtrieren und mit HCl bzw. NaOH auf pH 7,4 einstellen

##### **PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer, pH 7,4**

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	10,1 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,8 mM

##### **PBS-Otto-Puffer, pH 7,4**

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	10 mM
NaCl	140 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10 mM

##### **Waschpuffer**

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %

##### **Blockierlösung**

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %
HS	10 %

##### **Citrat-Puffer, pH 6,0**

Citratmonohydrat	0,32 g
Natriumcitratdihydrat	2,06 g

mit HCl bzw. NaOH auf pH 6,0 einstellen, 1h im Wasserbad bei 100°C kochen

**Tris-EDTA-Puffer, pH 8,5**

TRIS	1,2 g
EDTA	0,37 g

mit HCl bzw. NaOH auf pH 8,5 einstellen, 15' im Wasserbad bei 95°C inkubieren

**Molekularbiologie:****Agarosegel**

TBE	
Agarose	1,5 %

**NaOH für gDNA-Extraktion**

NaOH	25 mM
------	-------

**Tris-HCl für gDNA-Extraktion**

Tris-HCl	1 M, pH 8
----------	-----------

**10 x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer**

Tris Base	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20 mM

**DEPC-H<sub>2</sub>O**

DEPC in H <sub>2</sub> O	1/1000 V
--------------------------	----------

schütteln, üN geöffnet unter Abzug stehen lassen, dann autoklavieren

**IPN- Methode:****modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung**

Glucose	8,7 mM
Pyruvat	0,3 mM
L-Lactat	2,0 mM
$\alpha$ -Ketoglutarat	1,0 mM
L-Maleat	1,0 mM
Harnstoff	6,0 mM
BSA	6 g/100 ml
Vasopressin 8-Lysin	1 mU/100 ml
Gewaschene Erythrozyten (Human)	10 % Hämatokrit
Ampicillin	3 mg/100 ml
Flucloxacillin	3 mg/100 ml
Physiologische Aminosäuren	0,2-2,0 mM

die Lösung wurde während der Perfusion fortlaufend gegen ein 10-faches Volumen derselben Lösung ohne Erythrozyten und BSA dialysiert

**Elektronenmikroskopie:****Epon-Zusammensetzung**

Komp. A: Glycidether	23 g
Komp. B: 2-Dodecentylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	15,40 g
Komp. C: Methylnadicanhydrit (MNA)	10,20 g
in Becherglas einwiegen und 30' rühren	
Komp. D: 2,4,6,-Tri-Dimethylaminomethylphenol (DMP 30)	0,77 g
Komponente D einwiegen und 30' rühren	

**Cacodylat-Puffer**

Natriumcacodylat	0,1 M, pH 7,4
Saccharose	1%

**Uranylacetatlösung**

Uranylacetat	4%
--------------	----

### 3.1.7. Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2007/2010* geschrieben. Für die Bearbeitung der Serienbilder wurden *Adobe Photoshop 10* und *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA) verwendet. Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt. Bei der Literaturrecherche half *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit *AxioVision Rel.4.5* von Zeiss. Für die Aufzeichnung der TEM-Bilder wurde das Programm *EM-Menu 4.0* verwendet. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit *Amira 5.3* visualization software (Visage Imaging, USA).

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden im Einklang mit dem "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" behandelt. Auf optimale Haltungsbedingungen für Nager wurde geachtet (Temperatur  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 5\%$ , Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

#### Folgende Tierstämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Herkunft
C57/Bl6	C57/Bl6	Charles River, Sulzfeld
129SvJ	129SvJ	Charles River, Sulzfeld
<i>Lyst<sup>bg-J</sup></i> /J (Beige)	C57BL/6J	Charles River, Sulzfeld
Ren-1d-cre/cre	129SvJ	Eigenzucht aus Ren-1d-Ren/Cre (zur Verfügung gestellt von Sequeira Lopez, University of Virginia)

### **3.2.2. Histologie**

#### ***3.2.2.1. Fixierung des Nierengewebes***

Die Nieren von adulten Mäusen, die für immunhistochemische Färbungen bestimmt waren, wurden durch retrograde arterielle Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zunächst wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin (80 mg/kg KG i.p.) und Xylazin (16 mg/kg KG i.p.) anästhesiert. Daraufhin wurde das Abdomen geöffnet und die Bauchorta freigelegt, welche unterhalb des Abgangs der Arteriae renalis mit einer Gefäßklammer abgeklemmt wurde, so dass die Durchblutung der Nieren nicht beeinträchtigt wurde. Der Perfusionskatheter wurde distal zur Klemme in die A. renalis eingeführt und ebenfalls festgeklammert. Daraufhin wurde die untere Vena cava zum Zweck des Druckausgleichs geöffnet. Nach Entfernen der oberen Gefäßklammer wurde über den Perfusionskatheter 10 ml isotone NaCl-Lösung und 10 I.E./ml Heparin perfundiert. Eine erfolgreiche Perfusion machte sich durch eine rasche Entfärbung der Abdominalorgane bemerkbar. Daraufhin erfolgte die Perfusion mit 40 ml der frisch angesetzten 3 %-igen Paraformaldehydlösung mit einem konstanten Fluss von 40 ml/3 min. Die perfundierten Nieren wurden daraufhin entnommen und bis zur Paraffineinbettung in 70 % Methanol bei 4°C aufbewahrt oder für die Anfertigung von Kryoschnitten in Tissue-Tek-Medium eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### ***3.2.2.2. Einbettung in Paraffin***

Für die Paraffineinbettung folgte eine Überführung des Nierengewebes in Gewebe-Einbettkassetten und eine schrittweise Dehydrierung durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration:

- 2 x 30' 70 % Methanol (RT)
- 2 x 30' 80 % Methanol (RT)
- 2 x 30' 90 % Methanol (RT)
- 2 x 30' 100 % Methanol (RT)
- 2 x 30' 100 % Isopropanol (RT)
- 1 x 30' 100 % Isopropanol (45°C)
- 1 x 30' Isopropanol/Paraffin (1:1)-Gemisch (55°C)

- 2 x 24 h Paraffin (60°C)
- Einbettung in mit 60°C warmen Paraffin gefüllten Silikon-Kautschuk-Einbettformen und Aushärten bei RT

#### ***3.2.2.3. Anfertigung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung***

Nach Entfernen der eingebetteten Präparate aus den Silikon-Kautschuk-Einbettformen wurden diese jeweils mit heißem Paraffin auf einen Holzblock (2,5 cm x 2,5 cm x 1 cm) aufgeklebt und mit einer Rasierklinge angetrimmt. Der Block wurde in ein Rotationsmikrotom eingespannt. Es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen wurden. Daraufhin wurden die Schnitte bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend durch folgende Schritte entparaffiniert:

- 2 x 15' 100 % Xylol
- 3 x 5' 100 % Isopropanol
- 2 x 5' 100 % Methanol

#### ***3.2.2.4. Immunohistochemische Färbung***

Als Immunhistochemie wird die Identifikation oder der Nachweis antigener Komponenten in Gewebeschnitten oder Zellen bezeichnet. Zu diesem Zweck werden Antikörper benutzt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Goldpartikeln, Enzymen, oder Isotopen gekoppelt sind. Bei der verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zuerst ein Primärantikörper spezifisch an das zu untersuchende Epitop eines Antigens im Gewebeschnitt. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, welcher an Fluorophor gekoppelt ist und spezifisch an den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers bindet. Detektiert wird das Fluorophor des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex aus Primär- und Sekundärantikörper durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge.

#### **Standardprotokoll:**

- 3 x 5' waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer
- 30' blockieren mit 10 % HS und 1 % BSA in PBS-Otto bei RT (Abschwächung unspezifischer Bindungen)

- Inkubation des Primärantikörpers üN bei 4°C in einer Feuchtkammer (Verdünnung des Primärantikörpers in 10 % HS/1 % BSA in PBS-Otto)
- am folgenden Tag: 3 x 5' waschen der Präparate mit 1 % BSA in PBS-Otto-Puffer
- Inkubation des Sekundärantikörpers 1,5 h bei RT (unter Lichtausschluss)
- 3 x 5' waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer (unter Lichtausschluss)
- eindeckeln mit Einbettmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium).

Je nach verwendetem Primärantikörper konnte das Standardprotokoll (**S**) leicht modifiziert werden:

- Variante 1 (**V1**): Vor dem Blockieren mit 10 % HS: 20' Inkubation in Citratpuffer bei 95°C
- Variante 2 (**V2**): Vor dem Blockieren mit 10 % HS: 20' Inkubation in Tris-EDTA-Puffer bei 95°C
- Variante 3 (**V3**): Verdünnung des Primärantikörpers in 10%HS/1%BSA/0,1% TritonX in PBS-Otto-Puffer

Primärantikörper	Variante
chicken anti-Renin-IgG	S
mouse anti-Glattmuskel-aktin-IgG	S
rabbit anti-Calnexin-IgG	S
rabbit anti-SNAP 23-IgG	V1
mouse anti-SNAP 25-IgG	S
rabbit anti-RAB 3B-IgG	S
sheep anti-RAB 27A-IgG	V2
rabbit anti-VAMP 2-IgG	S
rabbit anti-VAMP 3-IgG	S
rabbit anti-VAMP 5-IgG	S
rabbit anti-VAMP 7-IgG	S
rabbit anti-VAMP 8-IgG	S
rabbit anti-Synaptotagmin 1-IgG	S
rabbit anti-Synaptotagmin 5/9-IgG	V1+V3
rabbit anti-Synaptotagmin 7-IgG	S
rabbit anti-munc 18-IgG	S



Primärantikörper	Variante
rabbit anti-LAMP 1-IgG	S
rabbit anti-CADPS 2-IgG	S
rabbit anti-Syntaxin 2-IgG	S
rabbit anti-Syntaxin 4-IgG	V1+V3

Nach dem Eindeckeln mit Einbettmedium wurden die Schnitte 30' im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und konnten dann unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

#### **3.2.2.5. Lichtmikroskopie - Akquisition und Digitalisierung**

Die Akquisition der fluoreszenzgefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Axiovert 200M Lichtmikroskops mit motorisierter Objektaufgabe von Zeiss, die Digitalisierung mit einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software *Axiovision Rel.4.5* von Zeiss. Für die weitere Bearbeitung der Daten war eine Konvertierung in 8 Bit notwendig. Um einen Qualitätsverlust zu vermeiden, wurde das Grafikformat TIFF verwendet.

### **3.2.3. Isoliert perfundierte Niere (IPN)**

#### **3.2.3.1. Präparation der Nieren**

Als Versuchstiere dienten männliche 10-12 Wochen alte Mäuse. Diese wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (80 mg/kg KG) und Xylazin (16 mg/kg KG) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte platziert. Daraufhin wurde die Bauchhöhle durch einen Schnitt geöffnet und die Aorta distal zur rechten renalen Arterie geklammert, so dass die Perfusion der rechten Niere während der darauffolgenden Insertion der Perfusionskanüle in die Bauchaorta distal zur Klammer nicht gestört war. Die Mesenterialarterie wurde ligiert und eine metallene Perfusionskanüle (0,8 mm OD) wurde in die Bauchaorta eingeführt. Nach Entfernung der Klammer wurde die Kanüle bis zum Ursprung der rechten renalen Arterie geschoben und in dieser Position fixiert. Daraufhin wurde die Aorta proximal zur rechten renalen Arterie ligiert und die Perfusion in situ mit einer anfänglichen Flussrate von 1 ml/min gestartet, wodurch eine länger andauernde Ischämie der rechten Niere vermieden wurde. Schließlich

wurde die Niere entnommen und in einer beheizbaren Feuchtkammer platziert, wo sie mit einem konstanten Druck (100 mmHg) perfundiert wurde. Der Perfusionsdruck wurde im inneren der Perfusionskanüle gemessen, mit einem potentiometrischen Schreiber aufgezeichnet und mit einer rückkopplungsgeregelten peristaltischen Pumpe konstant gehalten. Daraufhin wurde eine Kanüle (1,5 mm OD Polypropylenkatheter) in die Nierenvene eingeführt und dort befestigt, um den venösen Ausfluss abzuleiten und für die Messung der Reninaktivität zu sammeln. Das Perfusionsmedium bestand aus einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung, welche in einem beheizten (37°C) 200 ml Reservoir bereitgestellt und fortlaufend dialysiert wurde. Das Dialysat wurde mit 94 % O<sub>2</sub>/6 % CO<sub>2</sub> begast.

#### ***3.2.3.2. Pharmakologische Stimulation der Reninsekretion***

Nachdem ein konstanter Perfusionsdruck aufgebaut war, stabilisierte sich die Durchflussrate des Perfusats normalerweise innerhalb von 15 Minuten. Anschließend wurden dem Dialysat über einen bestimmten Zeitraum hinweg definierte Konzentrationen von Isoproterenol (3, 10, 30 nM) und/oder EGTA (3,1 mM) zugefügt, um die Reninsekretion zu stimulieren.

#### ***3.2.3.4. Fixierung des Nierengewebes***

Nach Beendigung des Versuchs wurde die Niere zuerst mit PBS gespült und anschließend drei Minuten mit einer Fixierlösung (2% Glutaraldehyd in PBS) perfundiert. Daraufhin wurde die Niere mit einer Rasierklinge in zwei Hälften geteilt und bis zur Einbettung für das Transmissionselektronenmikroskop in der Fixierlösung bei 4°C aufbewahrt.

### **3.2.4. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

#### ***3.2.4.1. Einbettung und Trimmen***

Die Einbettung des Nierengewebes in Epon erfolgte mit Hilfe einer automatischen Mikrowelle. Zuerst wurde das Gewebe mit einer acetongereinigten Rasierklinge in einer mit Cacodylatpuffer gefüllten Petrischale in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Blöcke geschnitten. Daraufhin wurde das Gewebe in den Einbettkörbchen platziert, in denen ebenfalls Cacodylatpuffer vorgelegt wurde. Dann wurde der Mikrowellenlauf gestartet, bei dem

das Einbettkörbchen mitsamt Nierengewebe nacheinander in unterschiedlich befüllte Reaktionsgefäße überführt wurde. Die Überführung des Gewebes erfolgte nach einer gewissen Zeitspanne (siehe Tabelle) automatisch von einem Gefäß ins nächste.

Folgendes Standardprotokoll für die Mikrowelleneinbettung wurde verwendet:

Zeitspanne (hh:mm:ss)	Maximaltemperatur (°C)	Reagenz
00:05:00	35	Cacodylat-Puffer
00:05:00	35	Cacodylat-Puffer
00:05:00	35	Cacodylat-Puffer
01:00:00	37	1% OsO <sub>4</sub> in Cacodylat-Puffer
00:05:00	37	Cacodylat-Puffer
00:05:00	37	Aqua bidest.
00:05:00	37	Aqua bidest.
00:05:00	37	50% Ethanol
00:05:00	37	70% Ethanol
00:05:00	37	95% Ethanol
00:05:00	37	100% Ethanol
00:05:00	37	100% Aceton
00:05:00	37	100% Aceton
00:15:00	40	Aceton:Epon-Gemisch 1:1
00:20:00	40	Aceton:Epon-Gemisch 1:3
00:20:00	50	Epon
00:20:00	50	Epon

Nach dem Lauf wurden die Präparate in mit Epon befüllte Polymerisationsförmchen umgebettet und in der Mikrowelle gehärtet.

Zeitspanne (s)	Maximaltemperatur (°C)
300	63
300	75
900	83
6300	83

Anschließend wurden die Präparate aus den Polymerisationsformen gelöst und für das Anfertigen von Ultradünnschnitten vorbereitet und getrimmt. Dazu wurden die Eponblöckchen in Halterungen eingespannt, die sowohl am Trimmgerät als auch am Ultramikrotom fixiert werden konnten. Daraufhin wurden die Blöckchen entweder mit

einer Rasierklinge oder unter Verwendung einer Fräse angetrimmt. Es wurde darauf geachtet, die Schnittfläche relativ klein zu halten, um beim Anfertigen der Ultradünnschnitte möglichst viele Schnitte auf einem Grid anordnen zu können. Für den Erhalt von Schnittbändern, wie man sie für Serienschnitte benötigt, erwies sich eine trapezförmige Schnittfläche als vorteilhaft.

#### **3.2.4.2. Anfertigen von Ultradünnschnitten**

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom mit Diamantklinge angefertigt. Vor dem Schneiden wurden die Klingen mit sterilfiltriertem Millipore-Wasser gewässert und ein optimaler Wasserspiegel am Mikrotom eingestellt. Die ca. 70nm dicken Schnitte befanden sich nach dem Scheidevorgang auf der Wasseroberfläche und wurden mit sogenannten „Fischgrids“ (unbefilmte Kupferslotgrids) abgenommen und auf einen mit Pioloform beschichteten Grid übertragen.

#### **3.2.4.3. Kontrastieren der Schnitte**

Die Grids mit den Ultradünnschnitten wurden mit einer 4 %-igen Uranylacetatlösung und einer 0,5 %-igen Bleicitratlösung kontrastiert.

- 30'-50' Inkubation im Dunkeln in 4 % Uranylacetat in PBS
- 4 x waschen in Millipore-Wasser
- max. 1' Inkubation in 0,5 %-iger Bleicitratlösung
- 4 x waschen in Millipore-Wasser
- Wasser mit Filterpapier möglichst schonend entfernen

Die Aufbewahrung der Ultradünnschnitte erfolgte in einer Gridbox.

#### **3.2.4.4. Elektronenmikroskopie - Akquisition und Digitalisierung**

Für die Akquisition der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Phillips CM12 Transmissionselektronenmikroskop mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode als Elektronenquelle und einer Beschleunigungsspannung von 120 keV verwendet. Die Belichtungszeit lag bei 800 bis 1000 ms. Die Digitalisierung der Aufnahmen erfolgte mit einer TEM-1000 Slow-Scan-CCD-Kamera der TVIPS-Tietz GmbH unter Verwendung des Programms *EM-Menu 4.0*. Um einen hohen Detailgrad der Aufnahmen bei gleichzeitig großen Bildausschnitten zu gewährleisten, wurden Einzelbilder bei hohen Vergrößerungen

aufgenommen und diese zu Montagen aus je 2 x 2 bis 5 x 5 Bildern zusammengefügt. Für die weitere Bearbeitung der Daten war eine Konvertierung in 8 Bit notwendig. Um Qualitätsverluste zu vermeiden, wurde das Grafikformat TIFF verwendet.

### 3.2.5. Dreidimensionale Rekonstruktion

#### 3.2.5.1. Datenaufbereitung mittels ImageJ

Eine Voraussetzung für die Portierung der Daten in die Rekonstruktionssoftware *Amira* waren Bilder mit konstanten Abmessungen. Da die Länge und Breite von Montagebildern nicht konstant war, wurden diese zuerst mit Hilfe der Grafiksoftware *ImageJ* zu einem Bildstapel (Stack) konvertiert. Zu diesem Zweck wurden alle Montagen mit dem Programm geöffnet und mit dem Modul "Stackbuilder" (**Plugins -> Stacks -> Stack Builder**) zusammengefasst. Dieses Modul vergrößert kleinere Bilder auf die Abmessungen des größten geladenen Bildes durch Anfügen von schwarzen Rändern. Der entstandene Stack besteht aus einer Abfolge von exakt gleich großen Bildern und wird als sogenannte "Image Sequence" gespeichert (**Save as -> Image Sequence**).

#### 3.2.5.2. Rekonstruktion mittels Amira

Die Image Sequence wurde daraufhin zur weiteren Bearbeitung in die Amira 5.4.1 Visualization Software auf einer Grafik-Workstation importiert. Für die Erstellung eines 3D-Modells war es wichtig eine korrekte Skalierung der Daten im dreidimensionalen Raum zu gewährleisten. Bei unseren elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit 3800facher Vergrößerung entsprach ein Pixel den Abmessungen 5,2 nm (Länge X) x 5,2 nm (Breite Y). Die Schnittdicke betrug 70 nm (Schnittdicke Z). Diese Werte wurden ins Programm eingetragen und somit die sogenannte "Bounding Box" definiert, welche die maximale Abmessung des Datensatzes in jeder Ebene des dreidimensionalen Raums beschreibt. Dadurch wird auch der Begriff Pixel im dreidimensionalen Raum durch den Begriff "Voxel" ersetzt und stellt eine quaderförmige Zelle mit den Abmessungen 5,2 x 5,2 x 70 nm dar.

Der nächste Schritt war die Alignierung der Einzelbilder des Image Stacks. Da die Serienschnitte variabel auf den Grids angeordnet waren, mussten die Einzelbilder im

Amira-Programm über Rotations- und Verschiebungsbewegungen in Deckung gebracht werden. Angewendet auf alle Schnitte entsteht so eine vollständig ausgerichtete Reninzelle.

Als nächstes wurden auf den Bildern Objekte von Interesse (Zellstrukturen) markiert und diese Markierungen einem definiertem Material zugeordnet, um daraus später die Oberfläche für diese Objekte berechnen zu können. Für diese Datensegmentierung (Labeling) standen verschiedene Tools zur Verfügung:

- **Brush:** Signale können im Freihandmodus umfahren werden
- **Magic Wand:** Signale werden durch das Festlegen einer Grauwertschwelle markiert (wirkt sich nur auf den mit dem ausgewählten Voxel verbundenen Bereich aus)

Weitere wichtige Werkzeuge waren:

- **Fill Holes:** Löcher im ausgewählten Material werden entfernt
- **Remove Islands:** kleine Material-Inseln (Artefakte) werden entfernt
- **Smooth Labels:** Materialränder werden geglättet
- **Interpolate:** ist eine Struktur auf einem fehlerhaften Bild nicht zu erkennen, so kann diese durch Interpolation der Bildinformation auf den Schnitten vor und nach dem Fehler berechnet werden
- **Threshold:** Signale werden durch das Festlegen einer Grauwertschwelle markiert (wirkt sich auf einen kompletten Schnitt aus)

Sämtliche Tools lassen sich sowohl auf alle Schnitte als auch auf einen Einzelschnitt anwenden. Aus den entstandenen Materialien wurden dann die Oberflächen der zu untersuchenden Zellstrukturen berechnet.

Als Grundlage für diese Berechnung wurden die erstellten Label-Dateien verwendet. Aus jedem Material entstand mit Hilfe des Moduls "SurfaceGen" (**Compute -> SurfaceGen**) eine separate Oberfläche, die daraufhin mit dem Modul "SurfaceView" räumlich dargestellt wurde. Die 3D-Modelle konnten dann durch folgende Tools nachbearbeitet werden:

- **SurfaceEditor:** Entfernung überflüssiger Oberflächen/Artefakte
- **Simplifier:** Reduzierung der Polygonzahl der Oberflächen
- **ParameterEditor:** nachträgliche Änderung der Farbe und Skalierung der Oberflächen

Zusätzlich können die Oberflächen mit dem Modul "SmoothSurface" (**Compute -> SmoothSurface**) geglättet werden.

Das fertige dreidimensionale Modell konnte nun beliebig rotiert und die verschiedenen Objekte räumlich analysiert werden. Neben der reinen Betrachtung der 3D-Modelle konnten Strecken und Winkel gemessen und die Volumina und Oberflächen der einzelnen Zellstrukturen bestimmt werden.

### 3.2.6. Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.6.1. Genotypisierung

Während die Beige-Mäuse über die Fellfarbe identifiziert werden konnten, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Ren-1d-Cre/Cre Tiere mittels PCR genotypisiert. Die Extraktion erfolgte mit der NaOH-Methode nach folgendem Protokoll:

- abschneiden von 2 mm Mausschwanz, dieser wird in einem 1,5 ml Cup mit 100 µl 25 mM NaOH versetzt
- Inkubation bei 96°C für 1-1,5 h im Thermocycler
- bis zur Auflösung des Schwanzes vortexen und 10 µl Tris HCl (pH 8) zugeben
- 6 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- 2 µl des erhaltenen Überstands (gDNA) werden in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt

#### 20 µl PCR-Reaktionsansatz

1 µl	sense Primer (10 pmol/µl)
1 µl	antisense Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	antisense Primer 2 (10 pmol/µl)
2,5 µl	dNTPs (2,5 mM)
4 µl	Puffer (GoTaq buffer green)
0,3 µl	GoTaq
8,2 µl	dd H <sub>2</sub> O
2 µl	gDNA

**Amplifizierungsprotokoll**

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94°C	2min	Aktivierung
35	94°C	30s	Denaturierung
	56°C	1min	Annealing
	72°C	1min	Elongation
1	72°C	2min	Elongation
1	4°C	∞	Store

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch horizontale Gelelektrophorese bei 120V der Größe nach aufgetrennt.

**3.2.6.2. Bestimmung der Reninaktivität**

Zur Bestimmung der Reninaktivität des Perfusats der IPN-Versuche wurde der venöse Ausfluss jeweils eine Minute lang im Abstand von 3 Minuten gesammelt. Die Proben wurden 10 Minuten lang bei 1500 g zentrifugiert und der Überstand bis zur Untersuchung der Reninaktivität bei -20°C gelagert.

Für die Bestimmung der Reninaktivität wurden die Perfusatproben bei 37°C 1,5 h mit Plasma von bilateral nephrektomierten männlichen Ratten inkubiert, welches als Reninsubstrat diente. Die Menge an generiertem Angiotensin I ( $\text{ng} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$ ) wurde durch einen Radioimmunassay (Byk & Diasorin) bestimmt. Die Reninsekretionsrate wurde aus dem Produkt der Reninaktivität und des venösen Flusses ( $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}_{\text{Niere}}^{-1}$ ) errechnet.

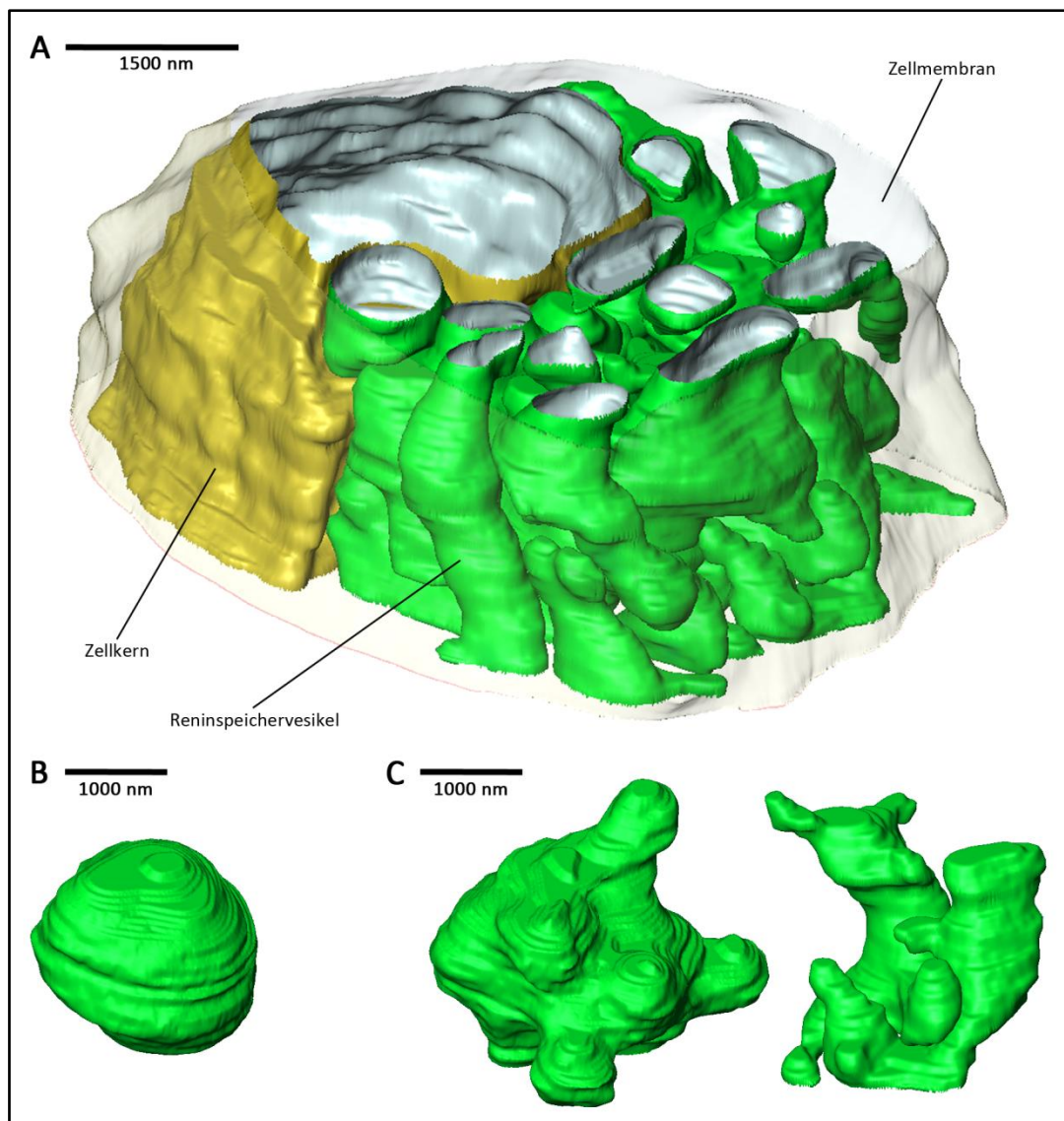


## 4. Ergebnisse

## **4.1. Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Wildtyp-Maus**

### **4.1.1. Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen**

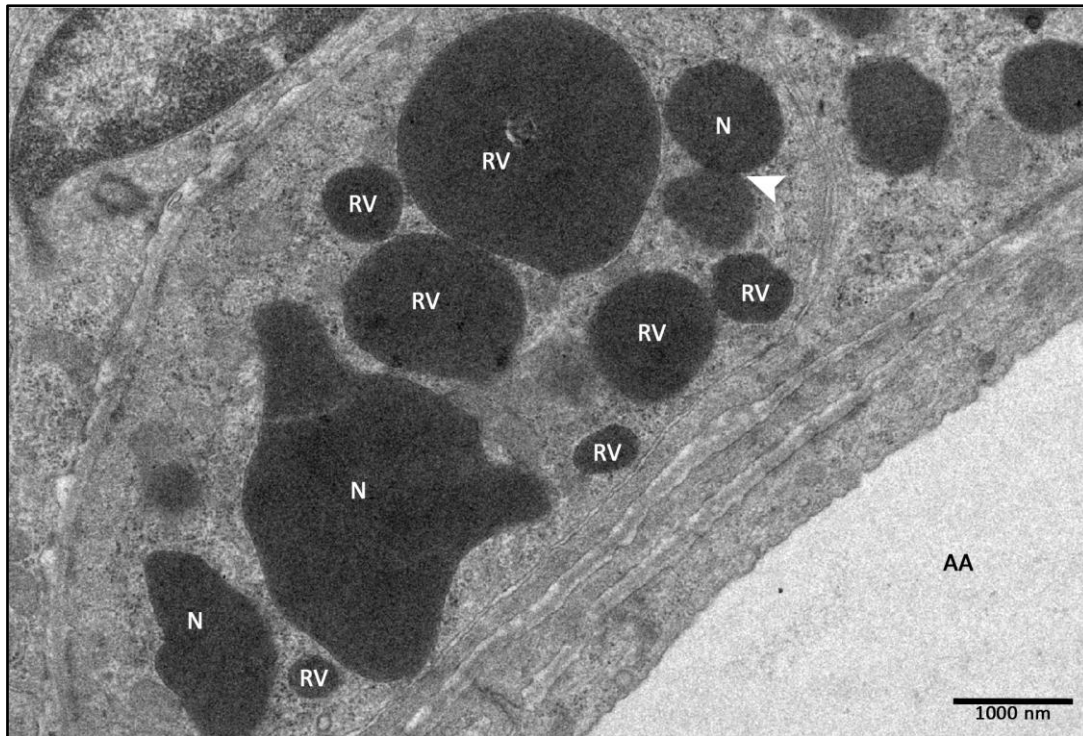
Zuerst wurde die Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen von genetisch unmodifizierten Wildtyp-Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Nieren nach der IPN-Technik freipräpariert, mit PBS bei konstantem Druck über die A. renalis gespült und anschließend sofort durch Perfusionsfixierung mit 2 %-iger Glutaraldehydlösung für die EM-Präparation vorbereitet. Es erfolgte zunächst keine pharmakologische Stimulation der Reninsekretion, damit die Morphologie der Vesikel im Ruhezustand untersucht werden konnte. Nach erfolgter Einbettung in Epoxydharz wurde eine Schnittserie von bis zu 100 70 nm dicken Ultradünnschnitten angefertigt. JG-Zellen wurden gesucht und bei 3800-facher Vergrößerung abfotografiert. Aus den entstandenen EM-Aufnahmen konnten mithilfe des Rekonstruktionsprogramms Amira 3-dimensionale Teilausschnitte dieser Zellen erstellt werden. Betrachtet man exemplarisch einen rekonstruierten Teilausschnitt einer unstimulierten JG-Zelle, dann fällt auf, dass die grün dargestellten Reninspeichervesikel neben dem Zellkern den größten Teil des Zellvolumens einnehmen (Abb. 6A). Viele, aber nicht alle Vesikel besitzen eine klassisch kugelförmige, in sich abgeschlossene Form (Abb. 6B). Einige Vesikel weisen auf 3-dimensionaler Ebene eine auffällige Morphologie auf. Sie sind nicht kugelförmig, sondern erscheinen vielmehr netzwerkartig erweitert, wobei manche Vesikel einander zu umfließen scheinen, ohne jedoch miteinander in Kontakt zu treten. Während einige dieser netzwerkartigen Vesikel eine völlig irreguläre Form besitzen, scheinen andere durch die Fusion mehrerer kugelförmiger Vesikel entstanden zu sein (Abb. 6C). Es konnten keinerlei Anzeichen für Exozytoseereignisse, wie zum Beispiel Kontakt von Vesikelmembran und Zellmembran, Omegastrukturen oder Austritt von Vesikelmateriale beobachtet werden. Auf TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten, aus denen das 3-dimensionale Modell erstellt wurde, sind Reninspeichervesikel leicht durch ihre verhältnismäßig hohe, meist homogene Elektronendichte erkennbar (Abb. 7). Man kann auch hier Vesikel mit klassischer



**Abb. 6: 3-Dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, unstimuliert)**

Reninspeichervesikel sind grün, der Zellkern gelblich und die Zellmembran transparent dargestellt. **A:** Gesamtübersicht des Teilausschnitts. Die Reninspeichervesikel liegen in der Zelle dicht aneinander und nehmen einen großen Teil des Zytoplasmavolumens ein. **B:** Viele Reninspeichervesikel besitzen eine klassische kugelförmige, in sich abgeschlossene Form. **C:** Manche Speicherstrukturen weisen eine atypische netzwerkartige Morphologie auf.

runder Form (RV) und netzwerkartige Vesikel (N) unterscheiden, wobei die netzwerkartigen Vesikel entweder völlig irregulär geformt sind, oder scheinbar durch Fusion von mehreren kleinen Vesikeln entstanden sind (Abb. 7, Pfeil). Die anderen Vesikel des untersuchten Ausschnitts liegen zwar eng aneinander, sind aber durch ihre Membranen deutlich voneinander abgegrenzt. Auch auf den TEM-Aufnahmen konnten keinerlei Anzeichen für eine Fusion oder den Kontakt von Vesikelmembran und Zellmembran beobachtet werden.



**Abb. 7: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, unstimuliert)**

Die Zelle liegt in der Nähe des Lumens der afferenten Arteriole (AA) und enthält sowohl elektronenoptisch dichte, reninhaltige Speichervesikel mit klassischer runder Form (RV), als auch irregulär geformte netzwerkartige Strukturen (N). Teilweise bestehen die netzwerkartigen Strukturen aus miteinander verschmolzenen runden Vesikeln (Pfeil).

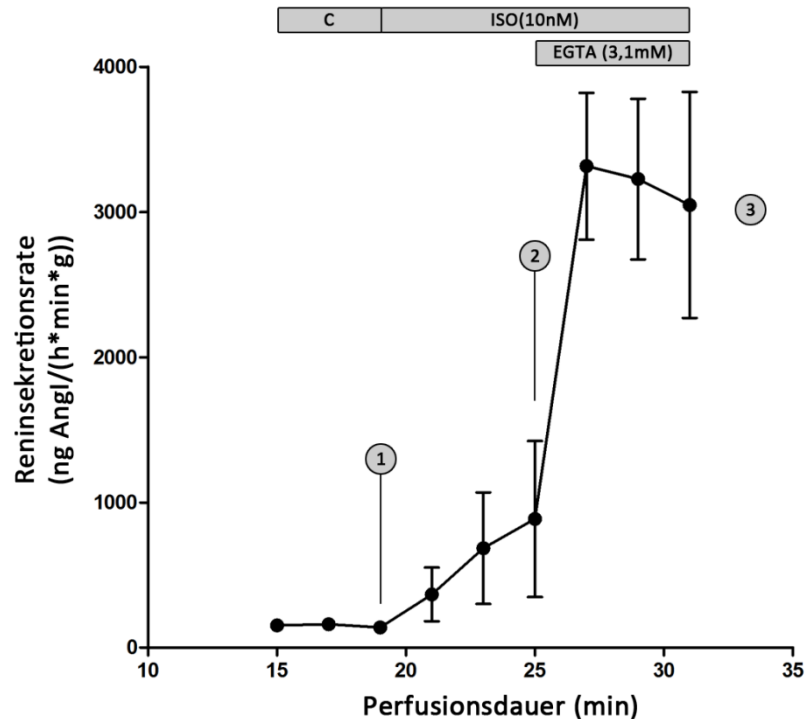
#### 4.1.2. Untersuchung von stimulierten JG-Zellen

Im Anschluss an die Rekonstruktion unstimulierter JG-Zellen wurde die Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen untersucht, deren Reninsekretionsrate durch pharmakologische Stimulation erhöht wurde. Zu diesem Zweck wurde die Niere nach der IPN-Technik freipräpariert und unter konstantem Druck mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Nachdem sich die Durchflussrate des Perfusats stabilisiert hatte, wurden diesem über bestimmte Zeiträume hinweg stimulierende Agenzien in definierter Konzentration hinzugefügt. Verwendet wurden Isoproterenol (ISO) oder Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) oder eine Kombination dieser beiden Stoffe. Isoproterenol ist ein  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonist, und führt durch Aktivierung des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors zu einem erhöhten cAMP-Spiegel in den JG-Zellen und damit zur Stimulation der Reninsekretion. EGTA bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und verringert so die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was ebenfalls zur Stimulation der Reninsekretion führt. Gegebenenfalls wurde der venöse Ausfluss der Niere für die

Messung der Reninsekretionsrate gesammelt. Anschließend wurde die Niere eine Minute mit PBS gespült und dann sofort durch Perfusion mit einer 2 %-igen Glutaraldehydlösung für die EM-Präparation vorbereitet. Es folgte die Einbettung in Epoxydharz und die Anfertigung von Ultradünnschnitten, aus denen mit Hilfe von Amira ein 3-dimensionales Modell eines Teils der JG-Zelle erstellt wurde. Um Auswirkungen der Stimulation auf die Vesikelmorphologie gezielt zuordnen zu können, wurden zuerst JG-Zellen rekonstruiert die nur mit Isoproterenol stimuliert wurden. Anschließend erfolgten Rekonstruktionen von mit EGTA stimulierten Zellen. Schließlich wurden Zellen rekonstruiert die mit einer Kombination dieser beiden pharmakologischen Wirkstoffe stimuliert wurden. Pro rekonstruiertem Teilausschnitt konnte mit Hilfe von Amira das durchschnittliche Vesikelvolumen (in fL), die durchschnittliche Vesikeloberfläche (in  $\mu\text{m}^3$ ) und das Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen (in %) errechnet werden. Die gezeigten Graphen repräsentieren die Mittelwerte aus den durchschnittlichen Volumina und Oberflächen verschiedener rekonstruierter Teilausschnitte.

#### ***4.1.2.1. Messung der Reninsekretionsrate unter kontrollierten Bedingungen***

Um die Wirkung von Isoproterenol und EGTA auf die Reninsekretionsrate zu beobachten, wurde der venöse Ausfluss der für eine Dauer von 12 Minuten stimulierten Niere alle drei Minuten für jeweils eine Minute gesammelt und die Reninkonzentration mittels RIA vermessen. Unter Berücksichtigung des venösen Flusses konnte daraus die Reninsekretionsrate in Abhängigkeit der Stimulationsdauer berechnet werden. Verglichen mit dem unstimulierten Kontrollzustand verdoppelt sich die Reninsekretionsrate während der sechsminütigen Stimulation mit Isoproterenol. Während der darauffolgenden sechsminütigen Stimulation mit Isoproterenol und EGTA kommt es zu einer sehr starken Stimulation der Reninsekretion. Die Reninsekretionsrate steigt um mehr als das 20-fache (Abb. 8).



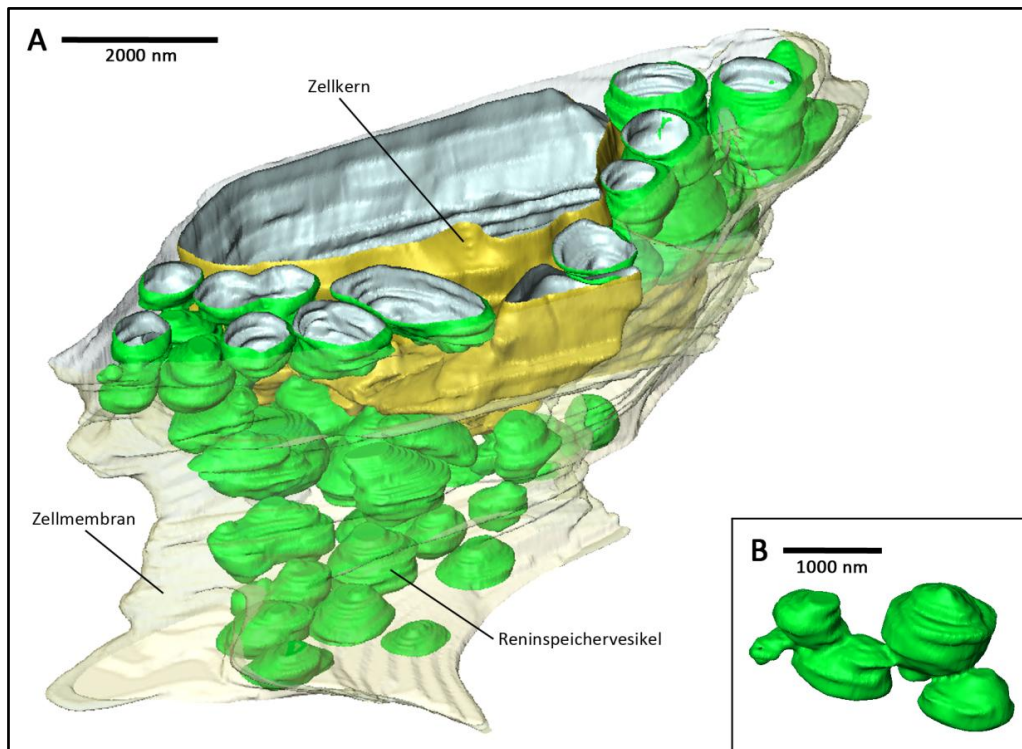
**Abb. 8: IPN-Protokoll von Wildtyp-Nieren (n=3)**

Nach einer Stabilisierungsdauer von 15 Minuten wurden Proben zur Bestimmung der basalen Reninsekretionsrate entnommen (Kontrollabschnitt C). Nach Beendigung des Kontrollabschnitts (Zeitpunkt 1) erfolgte die Stimulation durch Hinzufügen von 10 nM Isoproterenol zum Perfusat, was zu einer ca. 5-fachen Erhöhung der Reninsekretionsrate führte. Sechs Minuten nach Beginn der Stimulationsphase (Zeitpunkt 2) wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration durch Hinzufügen von 3,1 mM EGTA ins Perfusat verringert, was verglichen mit dem Basalwert zu einer ca. 20-fachen Erhöhung der Reninsekretionsphase führte. Ungefähr sechs Minuten nach dem Hinzufügen von EGTA (Zeitpunkt 3) wurde die Niere fixiert

#### 4.1.2.2. Stimulation mit Isoproterenol

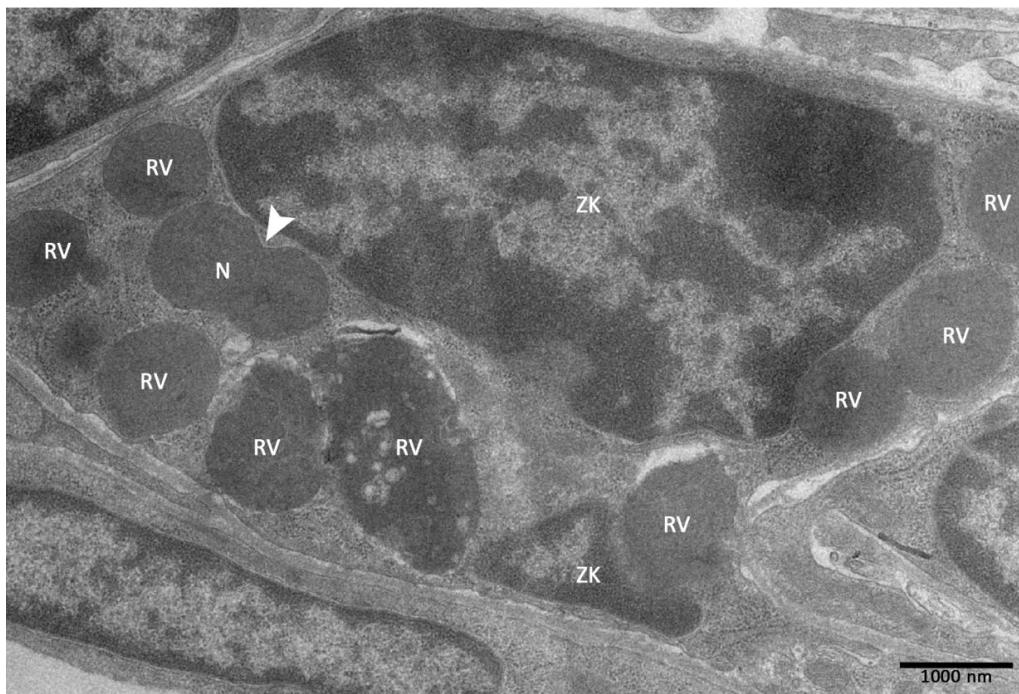
Zuerst wurden JG-Zellen rekonstruiert, deren Reninsekretion durch dreiminütige Zugabe von 10 nM Isoproterenol ins Perfusat stimuliert wurde. Es wurde festgestellt, dass sich die Morphologie der Reninspeichervesikel auf dieser Stimulationsstufe nicht von der der unstimulierten Wildtypzellen unterscheidet (Abb. 9A). Es existieren sowohl kugelförmige als auch netzwerkartige Vesikel. Wie in den unstimulierten JG-Zellen scheinen einige der netzwerkartigen Vesikel durch die Fusion mehrerer kleiner Vesikel entstanden zu sein (Abb. 9B), während andere eine irreguläre Form besitzen. Auch auf 2-dimensionaler Ebene unterscheidet sich die Struktur der Reninvesikel der stimulierten JG-Zellen nicht von der unstimulierten Zellen (Abb. 10). Desweiteren konnten wie bei unstimulierten JG-Zellen keinerlei Anzeichen für einen Exozytosevorgang gefunden werden. Zusätzlich dazu konnte aus den rekonstruierten Teilausschnitten mittels Amira durchschnittliche Werte für Vesikelvolumina und –oberflächen und das





**Abb. 9: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 3 min stimuliert mit Iso)**

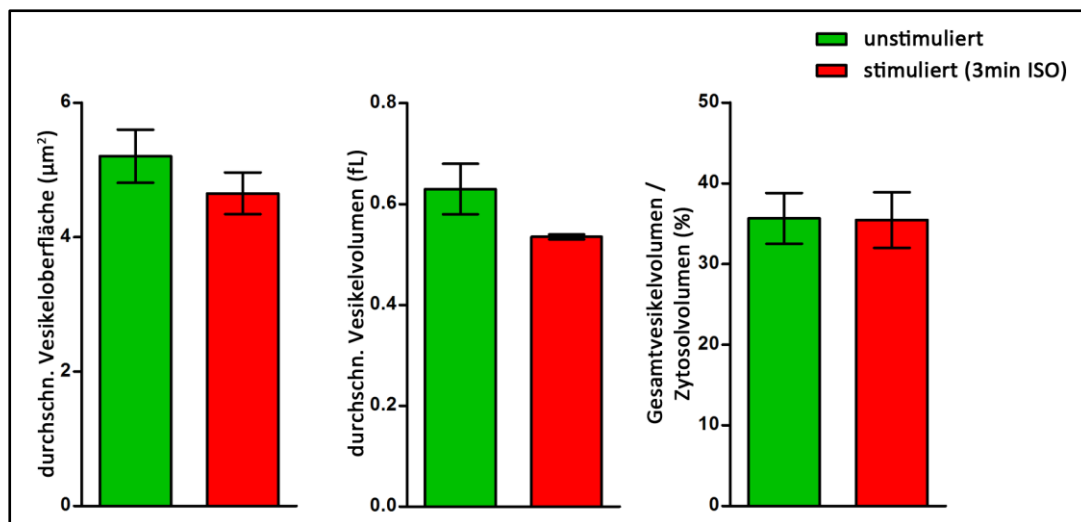
Reninspeichervesikel sind grün, der Zellkern gelblich und die Zellmembran transparent dargestellt. **A:** Gesamtübersicht des Teilausschnitts. Die Morphologie der Reninspeichervesikel unterscheidet sich nicht signifikant von der einer unstimulierten JG-Zelle. **B:** Einige Vesikel weisen eine klassische kugelartige Form auf, einige sind netzwerkartig erweitert und scheinen teilweise durch Fusion mehrerer kleiner Vesikel entstanden zu sein.



**Abb. 10: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 3 min stimuliert mit Iso)**

Derart stimulierte Zellen unterscheiden sich hinsichtlich der Vesikelmorphologie nicht signifikant von einer unstimulierten Wildtyp-Zelle. Sie enthalten sowohl elektronenoptisch dichte, reninhaltige Speichervesikel mit klassischer runder Form (RV), als auch irregulär geformte netzwerkartige Strukturen (N). Teilweise bestehen die netzwerkartigen Strukturen aus miteinander verschmolzenen runden Vesikeln (Pfeil).

Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen berechnet werden. Die unstimulierten Wildtyp-JG-Zellen und die stimulierten Wildtyp-JG-Zellen unterscheiden sich hier nicht signifikant (Abb. 11). Die durchschnittliche Vesikeloberfläche der unstimulierten JG-Zellen beträgt  $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ , die der stimulierten Zellen  $4,65 \pm 0,31 \mu\text{m}^2$ . Das durchschnittliche Vesikelvolumen der unstimulierten Zellen beträgt  $0,63 \pm 0,05 \text{ fL}$ , das der stimulierten Zellen  $0,53 \pm 0,005 \text{ fL}$ . Das Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen bei unstimulierten Zellen beträgt  $35,65 \pm 3,15 \%$  und bei stimulierten Zellen  $35,45 \pm 3,45 \%$ .



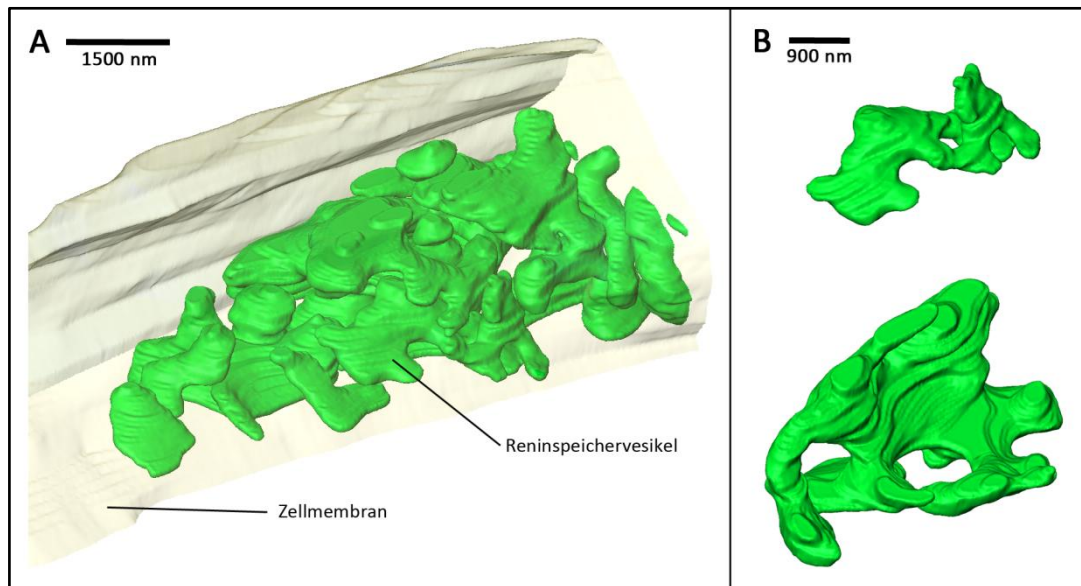
**Abb. 11: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 3 min stimuliert mit Iso)**

Verglichen werden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikeloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten JG-Zellen (n=2) mit den Mittelwerten von für eine Dauer von drei Minuten mit 10 nM Isoproterenol stimulierten JG-Zelle (n=2). Die Mittelwerte der stimulierten Zellen unterscheiden sich bei dieser Stimulationsstufe nicht signifikant von denen der unstimulierten Zellen.

#### 4.1.2.3. Stimulation mit EGTA

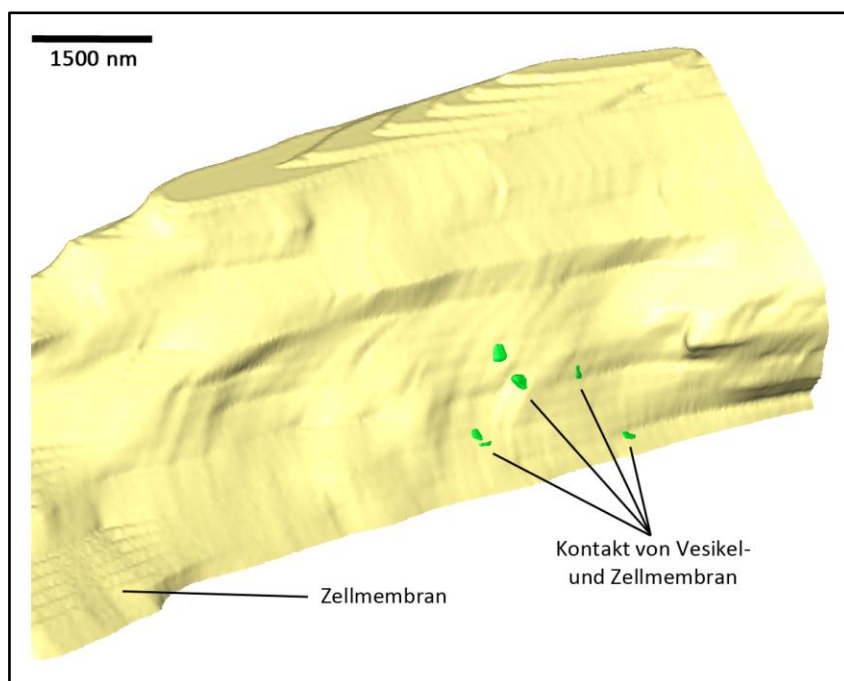
Daraufhin wurden JG-Zellen durch sechsminütige Zugabe von 3,1 mM EGTA ins Perfusat stimuliert und eine repräsentative Zelle rekonstruiert. Die Morphologie der Reninvesikel des rekonstruierten Teilausschnitts entspricht auf den ersten Blick der der unstimulierten Zelle, jedoch ist die Verteilung von kugelförmigen und netzwerkartigen Vesikel verändert. Der Vernetzungsgrad ist in einer mit EGTA stimulierten JG-Zelle deutlich erhöht, es existieren mehr netzwerkartige als kugelförmige Vesikel, während in einer unstimulierten Zelle eine größere Anzahl von kugelförmigen Vesikeln vorhanden ist (Abb. 12A, B). Darüber hinaus konnten erstmals Kontakte von Vesikel- und Zellmembran beobachtet werden, die auf Exozytoseereignisse hindeuten. Sowohl kugelförmige als auch netzwerkartige Vesikel standen mit der Zellmembran in Kontakt





**Abb. 12: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 6 min stimuliert mit EGTA)**

Reninspeichervesikel sind grün und die Zellmembran transparent dargestellt. Im rekonstruierten Teilausschnitt war kein Zellkern vorhanden. **A:** Gesamtübersicht des Teilausschnitts. Die Morphologie der Reninspeichervesikel entspricht auf den ersten Blick der der unstimulierten Zelle, es liegt jedoch ein höherer Vernetzungsgrad vor. **B:** Der Anteil an irregulär geformten, netzwerkartigen Vesikeln ist deutlich erhöht.

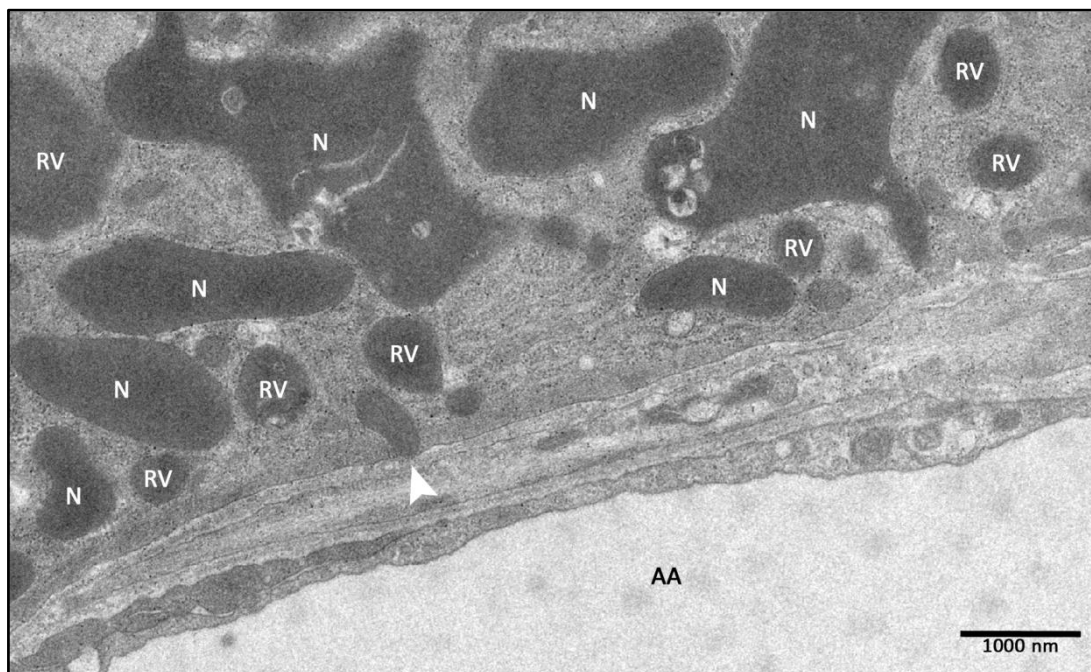


**Abb. 13: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 6 min stimuliert mit EGTA)**

Reninspeichervesikel sind grün, und die Zellmembran beige dargestellt. Man erkennt mehrere Kontakte von Vesikel- und Zellmembran. Diese Kontakte traten sowohl bei kugelförmigen als auch bei netzwerkartigen Vesikeln auf.

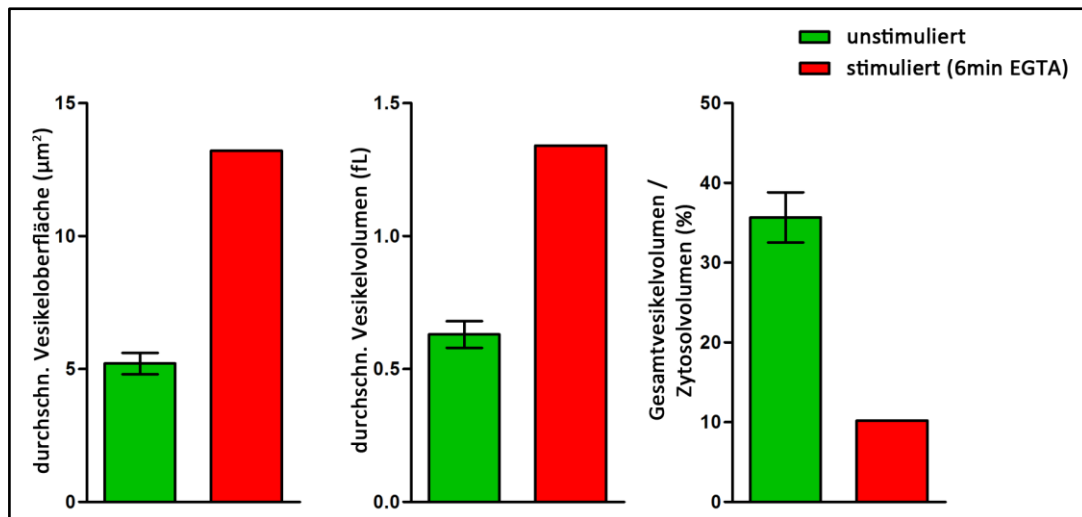
(Abb. 13). Betrachtet man eine TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnitts einer mit EGTA stimulierten JG-Zelle, so fällt auch hier eine höhere Vernetzung der Reninspeichervesikel auf (Abb. 14). Ein Kontakt von Vesikelmembran und Zellmembran ist exemplarisch gekennzeichnet (Abb. 14, Pfeil). Es konnte kein Austritt von Vesikel-

material ins Interstitium beobachtet werden. Die für diesen Teilausschnitt berechneten Werte für durchschnittliches Vesikelvolumen, durchschnittliche Vesikeloberfläche und Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen unterscheiden sich deutlich vom jeweiligen Durchschnittswert der unstimulierten Zellen. Da jedoch, im Gegensatz zu den unstimulierten Werten, für diese Berechnung nur eine einzige Teilrekonstruktion zur Verfügung stand, können nur tendenzielle Aussagen getroffen werden. Volumen und Oberfläche der Reninspeichervesikel der für eine Dauer von



**Abb. 14: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 6 min stimuliert mit EGTA)**  
Die Zelle liegt in der Nähe des Lumens der afferenten Arteriole (AA) und enthält sowohl elektronenoptisch dichte, reninhaltige Speichervesikel mit klassischer runder Form (RV), als auch irregulär geformte netzwerkartige Strukturen (N). Im Vergleich zur unstimulierten JG-Zelle fällt eine erhöhte Anzahl von netzwerkartigen Vesikeln auf. Ein Kontakt von Vesikelmembran zu Zellmembran ist exemplarisch gekennzeichnet (Pfeil).

sechs Minuten mit EGTA stimulierten JG-Zelle sind bei dieser 3-dimensionalen Rekonstruktion erhöht, während das Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen abnimmt (Abb. 15). Das durchschnittliche Vesikelvolumen der mit EGTA stimulierten Zelle ist mit 1,34 fL mehr als doppelt so groß wie das der unstimulierten Zellen ( $0,63 \pm 0,05$  fL). Die durchschnittliche Vesikeloberfläche der stimulierten Zelle ist mit  $13,21 \mu\text{m}^2$  ebenfalls mehr als doppelt so groß ist wie die der unstimulierten Zelle ( $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ ). Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen bei der stimulierten Zelle mit 10,2% gegenüber der unstimulierten Zelle ( $35,65 \pm 3,15$  %) um den Faktor 3 kleiner.



**Abb. 15: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 6 min stimuliert mit EGTA)**

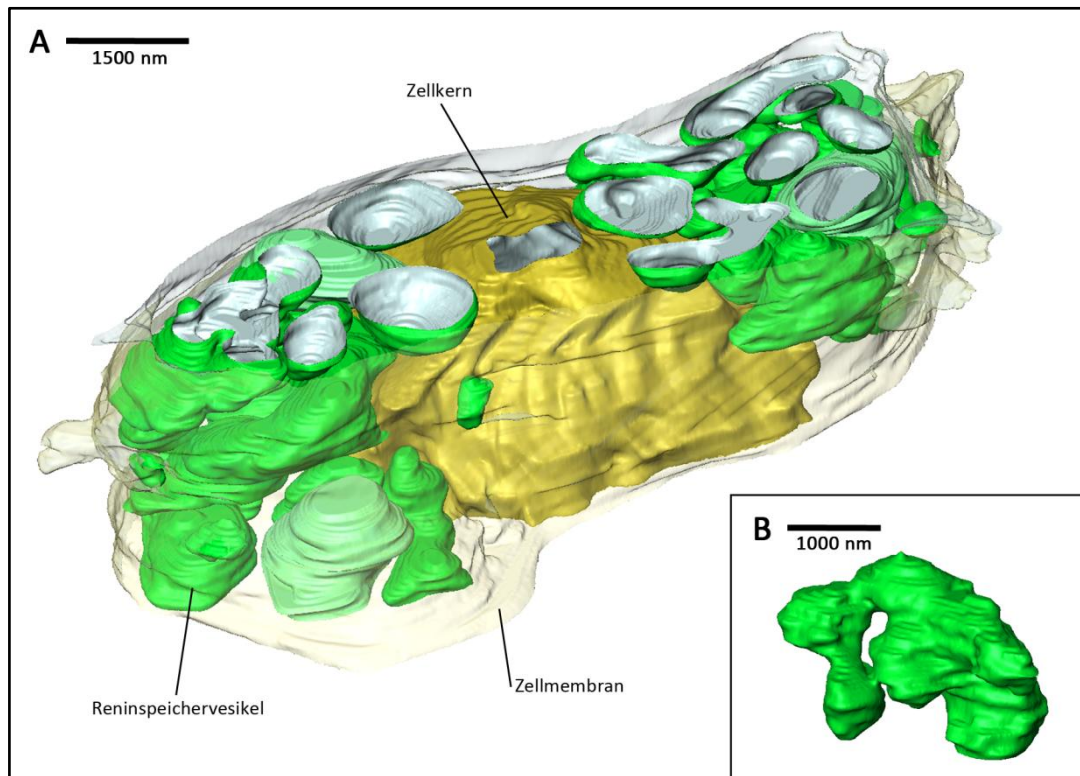
Verglichen werden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikeloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten JG-Zellen ( $n=2$ ) mit den Werten einer für eine Dauer von sechs Minuten mit 3,1 mM EGTA stimulierten JG-Zelle ( $n=1$ ). Bei der stimulierten Zelle ist tendenziell eine Erhöhung von durchschnittlichem Volumen und Oberfläche zu beobachten, während das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen bei der stimulierten Zelle reduziert ist.

#### **4.1.2.4. Stimulation mit Isoproterenol und EGTA**

##### Zehnminütige Stimulation der Reninsekretion:

Der nächste Schritt stellte die Untersuchung einer JG-Zelle dar, deren Reninsekretion stärker stimuliert wurde. Die Stimulation erfolgte durch zehnminütige kombinierte Zugabe von 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA ins Perfusat. Es wurden Teilausschnitte von zwei repräsentativen Zellen rekonstruiert. Bei Betrachtung der rekonstruierten Teilausschnitte sind keine Unterschiede bezüglich der allgemeinen Morphologie der Reninspeichervesikel erkennbar (Abb. 16A). Nach wie vor existieren sowohl vereinzelte kugelförmige Vesikel als auch netzwerkartige Vesikel (Abb. 16B). Der Anteil an netzwerkartigen Vesikeln scheint, wie schon bei der nur mit EGTA stimulierten Zelle, verglichen mit unstimulierten Wildtypzellen leicht erhöht zu sein. Auffällig sind einige Vesikel, die eine geringere Elektronendichte als normale Reninspeichervesikel aufweisen. Diese in der gezeigten 3-dimensionalen Rekonstruktion hellgrün dargestellten Vesikel sind stets kugelförmig und stehen nicht mit anderen, elektronendichten Vesikeln oder der Zellmembran in Kontakt (Abb. 17A). Im gezeigten Teilausschnitt der JG-Zelle wurden vier Kontakte von Vesikel- und Zellmembran beobachtet. Der Kontakt erfolgte stets bei elektronendichten Vesikeln, nicht bei Vesikeln mit geringerer Elektronendichte (Abb. 17B). Der Austritt von

Vesikelmateriale in den Interzellulärraum konnte nicht beobachtet werden. Betrachtet man eine TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes der stimulierten JG-Zelle, sind die Vesikel mit geringer Elektronendichte klar erkennbar. Ihre Elektronendichte entspricht



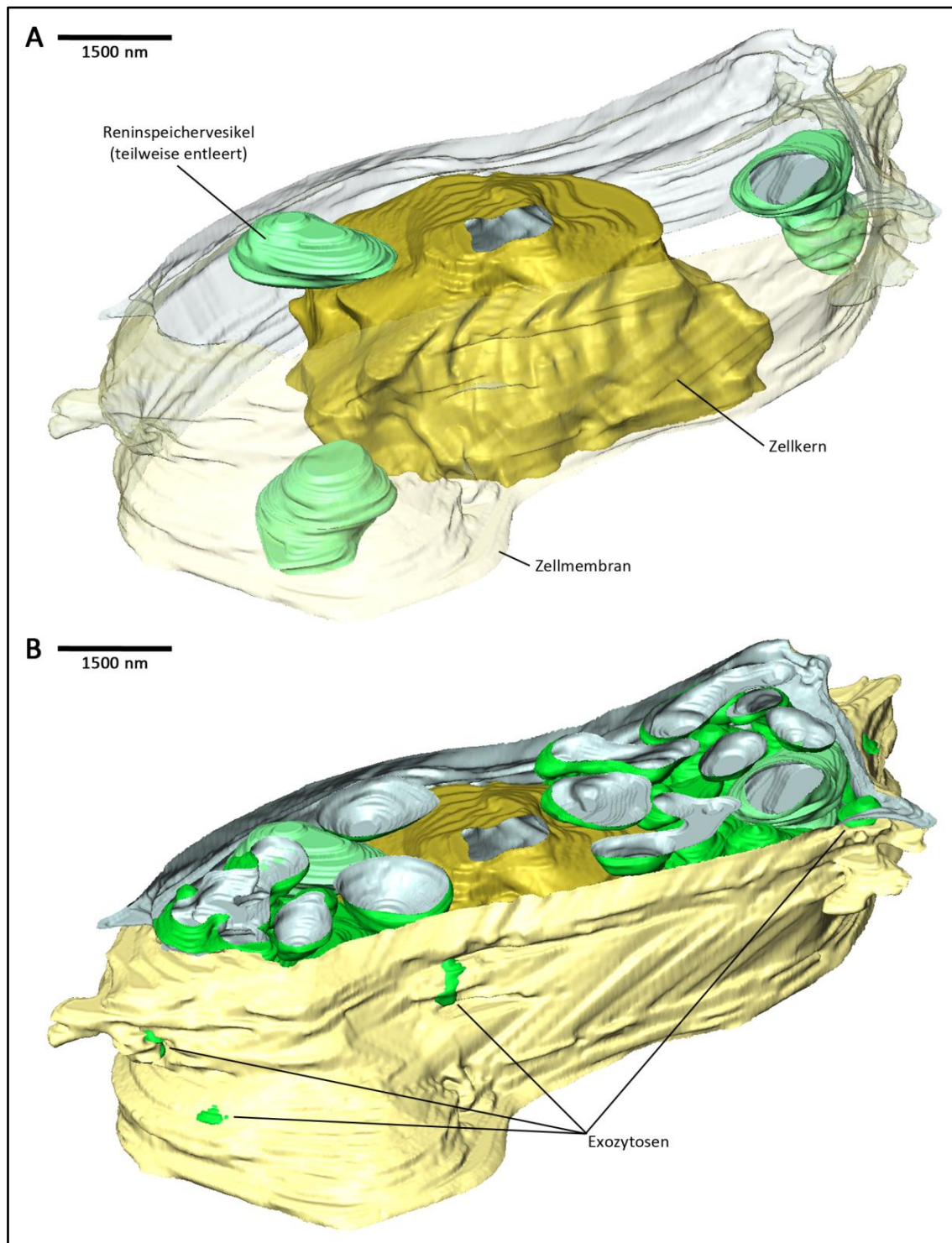
**Abb. 16: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)**

Reninspeichervesikel sind grün, der Zellkern gelblich und die Zellmembran transparent dargestellt. A: Gesamtübersicht des Teilausschnitts. Bei zehnmütiger Stimulation unterscheidet sich die allgemeine Morphologie der Reninspeichervesikel nicht von der der unstimulierten JG-Zelle. B: Es existieren sowohl kugelförmige als auch netzwerkartige Vesikel, wobei der Anteil von netzwerkartigen Vesikeln verglichen mit der unstimulierten JG-Zelle erhöht zu sein scheint.

in etwa der des Zytoplasmas, sie sind jedoch von diesem klar durch eine Vesikelmembran abgegrenzt (Abb. 18A). Kontakte von Vesikel- und Zellmembran konnten sowohl bei kugelförmigen als auch bei netzwerkartigen Vesikeln, nicht aber bei Vesikeln mit geringer Elektronendichte beobachtet werden (Abb. 18B, Pfeil). Auch bei den Rekonstruktionen der für zehn Minuten stimulierten JG-Zellen wurden jeweils die durchschnittliche Vesikeloberfläche, das durchschnittliche Vesikelvolumen und das Verhältnis von Vesikelvolumen zu Zytoplasma berechnet. Sowohl Vesikelvolumen als auch Vesikeloberfläche sind bei den für zehn Minuten mit 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA stimulierten JG-Zellen im Vergleich zu unstimulierten JG-Zellen signifikant vergrößert (Abb. 19). Das durchschnittliche Vesikelvolumen der stimulierten Zellen ist mit  $1.08 \pm 0.07$  fL fast doppelt so groß wie das der unstimulierten Zellen ( $0.63 \pm 0.05$



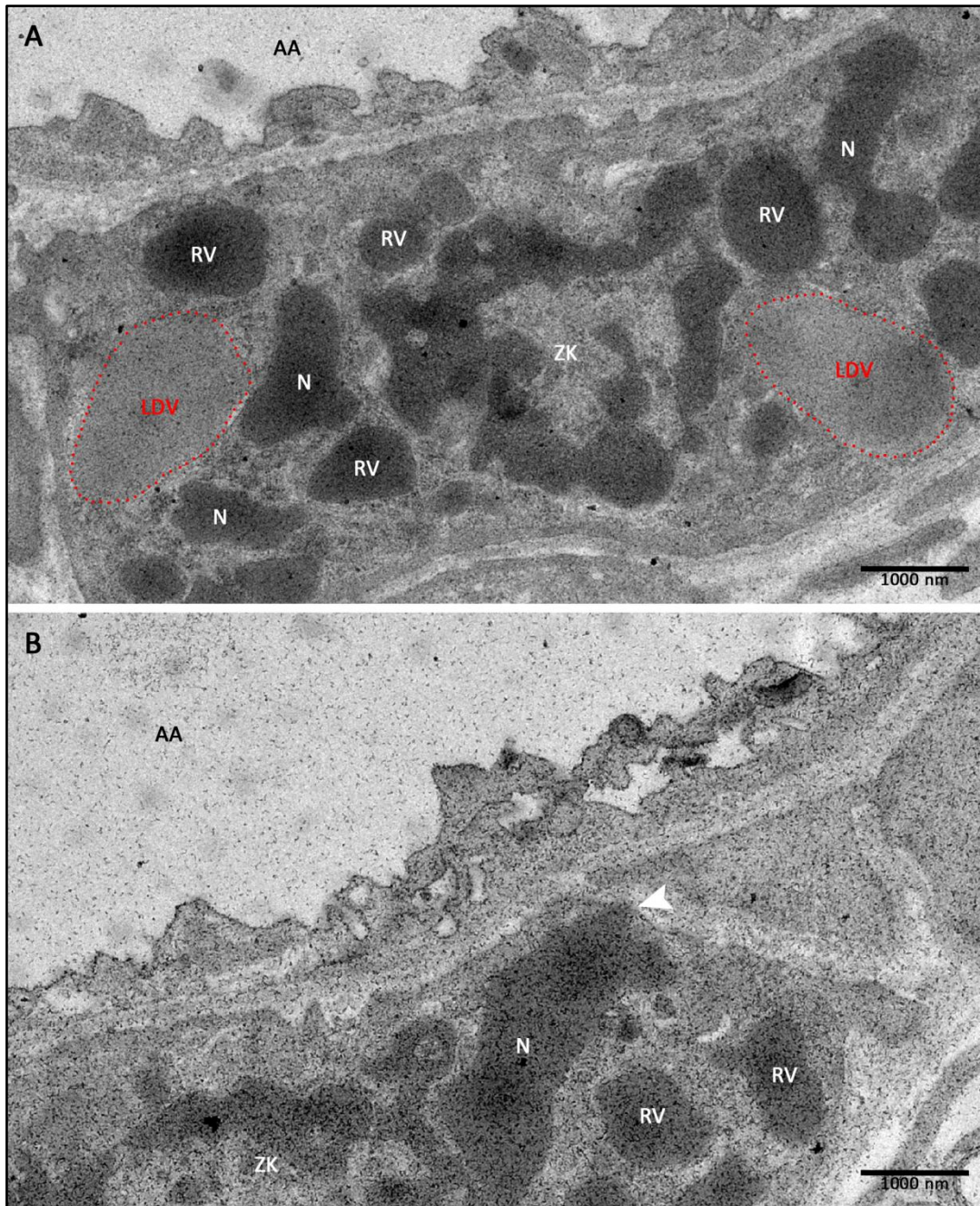
fl). Die durchschnittliche Vesikeloberfläche der stimulierten Zellen ist mit  $8,83 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ , verglichen mit dem Wert der unstimulierten Zellen ( $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ ), um mehr



**Abb. 17: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)**

**A:** Der Zellkern ist gelblich und die Zellmembran transparent dargestellt. Man kann kugelförmige, in hellgrün dargestellte Vesikel mit geringer Elektronendichte beobachten die jedoch weder mit der Zellmembran noch mit anderen Vesikeln normaler Dichte (ausgeblendet) in Kontakt stehen. **B:** Die Transparenz der Zellmembran wurde reduziert. An vier Stellen konnten Kontakte zwischen Vesikel- und Zellmembran beobachtet werden. Diese fanden sowohl bei kugelförmigen und netzwerkartigen Vesikeln, nicht aber bei Vesikeln mit geringer Elektronendichte statt.

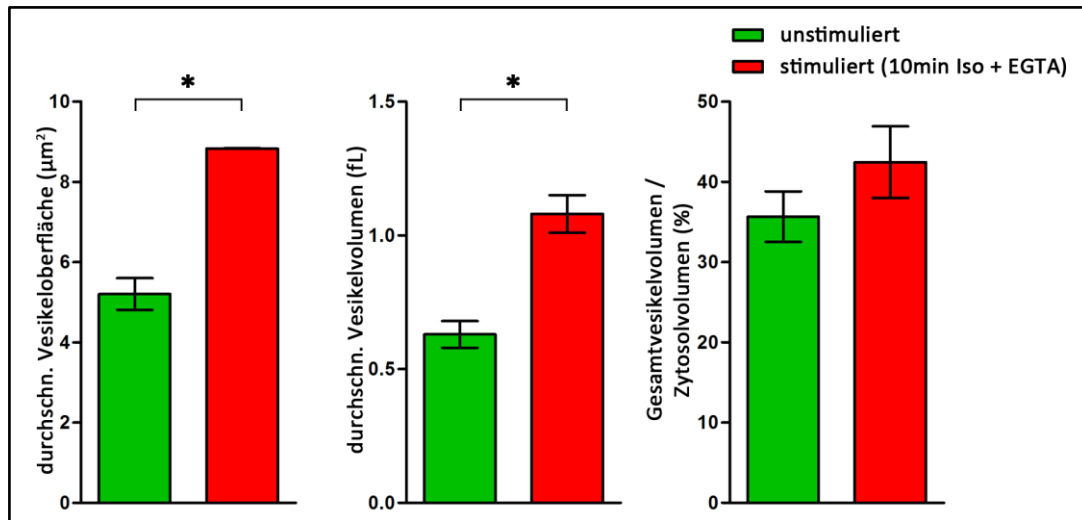
als ein Drittel vergrößert. Keine signifikante Abweichung liefert der Wert für das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen der stimulierten Zelle ( $42,45 \pm 4,45 \%$ ) gegenüber der unstimulierten Zelle ( $35,65 \pm 3,15 \%$ ).



**Abb. 18: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)**

Die Zelle enthält sowohl elektronenoptisch dichte, reninhaltige Speichervesikel mit klassischer runder Form (RV), als auch irregulär geformte netzwerkartige Strukturen (N), zusätzlich dazu ist der Zellkern (ZK) erkennbar. **A:** Auffällig sind mehrere Vesikel mit geringer Elektronendichte (low density vesicles – LDV). **B:** Im Gegensatz zur unstimulierten JG-Zelle konnten mehrere Kontakte von Vesikel- und Zellmembran beobachtet werden (Pfeil). Diese Kontakte fanden sowohl bei netzwerkartigen als auch bei kugelförmigen Vesikeln statt.



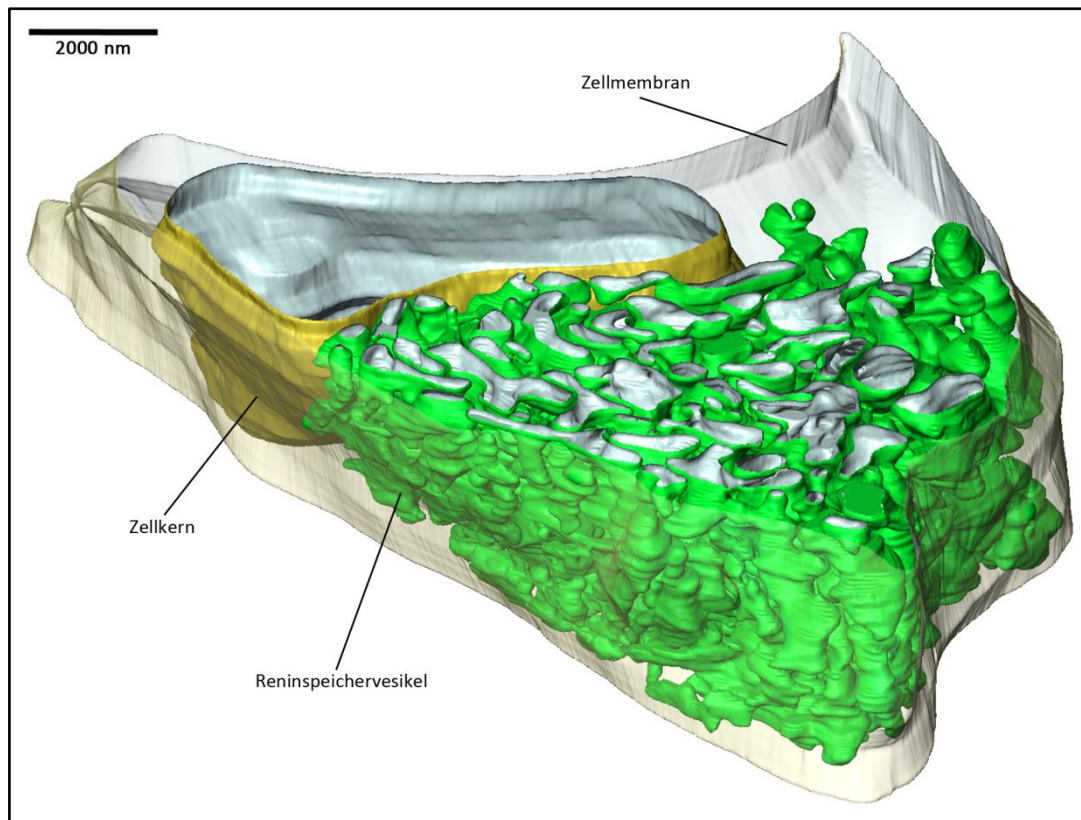


**Abb. 19: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)**

Verglichen werden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikeloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten JG-Zellen (n=2) mit den Mittelwerten von für eine Dauer von zehn Minuten mit 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA stimulierten JG-Zellen (n=2). Sowohl die durchschnittliche Vesikeloberfläche als auch das durchschnittliche Vesikelvolumen der stimulierten JG-Zellen sind im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant vergrößert (\*=signifikant,  $p < 0,05$ ). Beim Verhältnis von Gesamtvesikel- zu Zytosolvolumen konnte keine signifikante Abweichung festgestellt werden.

#### Zwölfminütige Stimulation der Reninsekretion:

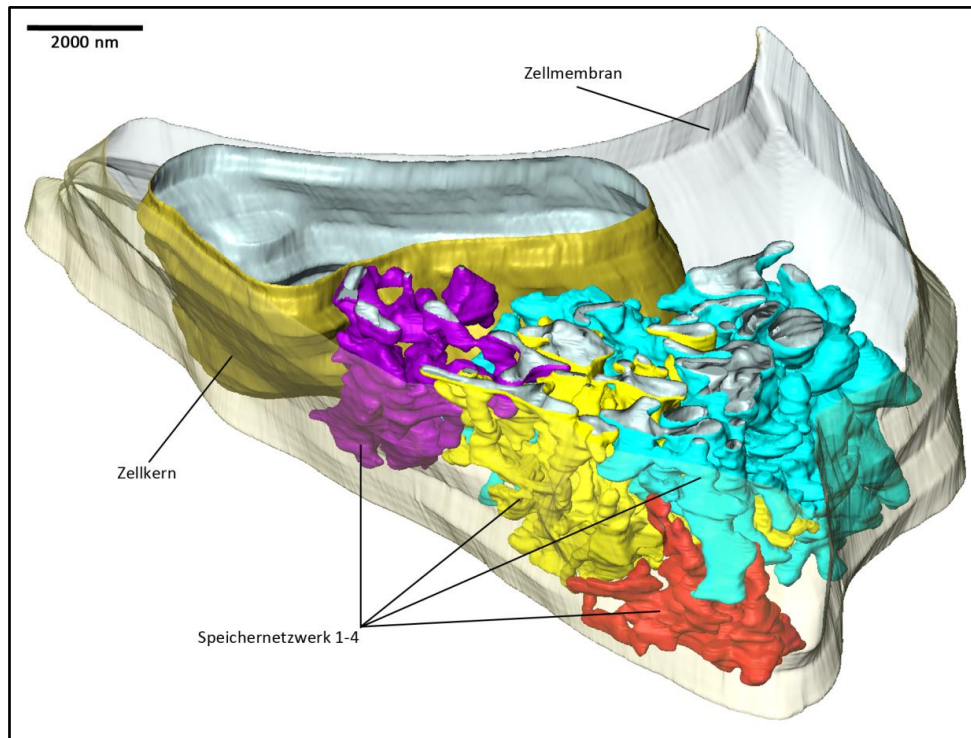
Daraufhin wurden JG-Zellen untersucht, die für eine Dauer von 12 Minuten stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte für eine Dauer von sechs Minuten durch Zugabe von 10 nM Isoproterenol und sofort anschließend für eine Dauer von weiteren sechs Minuten durch Zugabe von 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA ins Perfusat. Es wurde ein Teilausschnitt einer repräsentativen JG-Zelle rekonstruiert. Die Morphologie der Reninspeichervesikel der JG-Zelle weist auf den ersten Blick nur wenige Besonderheiten auf. Die Reninspeichervesikel liegen im Zellinneren sehr dicht aneinander. Desweiteren konnten nur wenige kugelförmige Vesikel gefunden werden, der Großteil der Reninvesikel ist netzwerkartig erweitert (Abb. 20). Bei genauerer Untersuchung des 3-dimensionalen Teilausschnitts wird jedoch deutlich, dass das Renin in dieser JG-Zelle nicht in vielen separaten netzwerkartigen Vesikel gespeichert wird, sondern dass diese Vesikel stattdessen oftmals miteinander in Kontakt stehen. Sie bilden einige wenige, jeweils einen großen Teil des Zellvolumens einnehmende Speichernetzwerke (Abb. 21). Diese Speichernetzwerke ziehen sich vom Rand der Zelle bis in weite Bereiche des Zellinneren. Der Vernetzungsgrad der für eine Dauer von 12 Minuten stimulierten JG-Zelle ist sowohl im Vergleich zu unstimulierten JG-Zellen als auch im Vergleich zu zehnminütig stimulierten JG-Zellen deutlich erhöht. Im rekon-



**Abb. 20: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)**  
 Reninvesikel sind grün, der Zellkern gelblich und die Zellmembran transparent dargestellt. Die Reninvesikel liegen im Zytosol dicht aneinander. Es existieren nur noch wenige kugelförmige Vesikel, ein Großteil besitzt eine netzwerkartige Form.

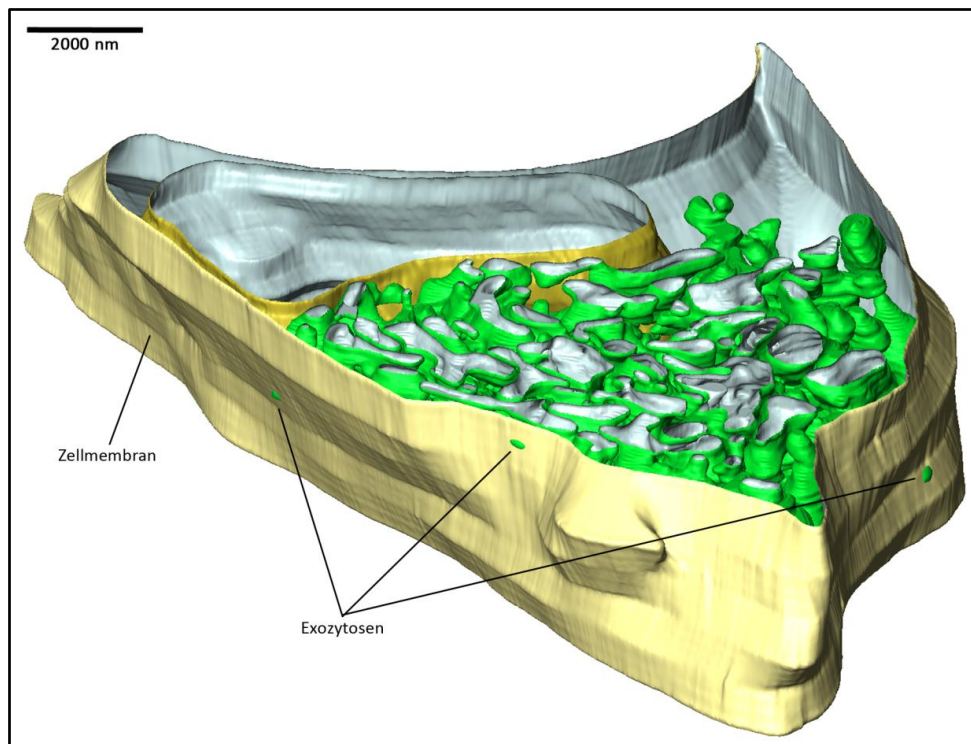
struierten Teil der JG-Zelle konnten mehrere Exozytoseereignisse beobachtet werden. Es wurden sowohl Kontakte von kleineren Vesikeln als auch von größeren Speichernetzwerken mit der Zellmembran beobachtet. Teilweise kam es zu mehreren Kontakten zwischen der Vesikelmembran eines Speichernetzwerks und der Zellmembran (Abb. 22). Betrachtet man die 2-dimensionalen Ultradünnschnitte dieser JG-Zellen, so ist der hohe Vernetzungsgrad der Reninvesikel nicht auf den ersten Blick erkennbar, da auch rund und abgeschlossen wirkende Vesikel 3-dimensional mit einem Speichernetzwerk (Abb. 23, SN) verbunden sein können. Es existieren nur wenige wirklich kugelförmige Vesikel (Abb. 23, \*). Wie bereits erwähnt konnten mehrere Exozytoseereignisse beobachtet werden, die auch auf den Ultradünnschnitten erkennbar waren. Es wurden mehrere Kontakte zwischen der Vesikelmembran von Speichernetzwerken mit der Zellmembran (Abb. 23A, B, C) beobachtet, wobei in einem Fall möglicherweise Vesikelinhalt austritt (Abb. 23C). Auch einige kugelförmige Vesikel standen mit der Zellmembran in Kontakt (Abb. 23D). Bei der Auswertung der durchschnittlichen Vesikeloberfläche und des durchschnittlichen Vesikelvolumens





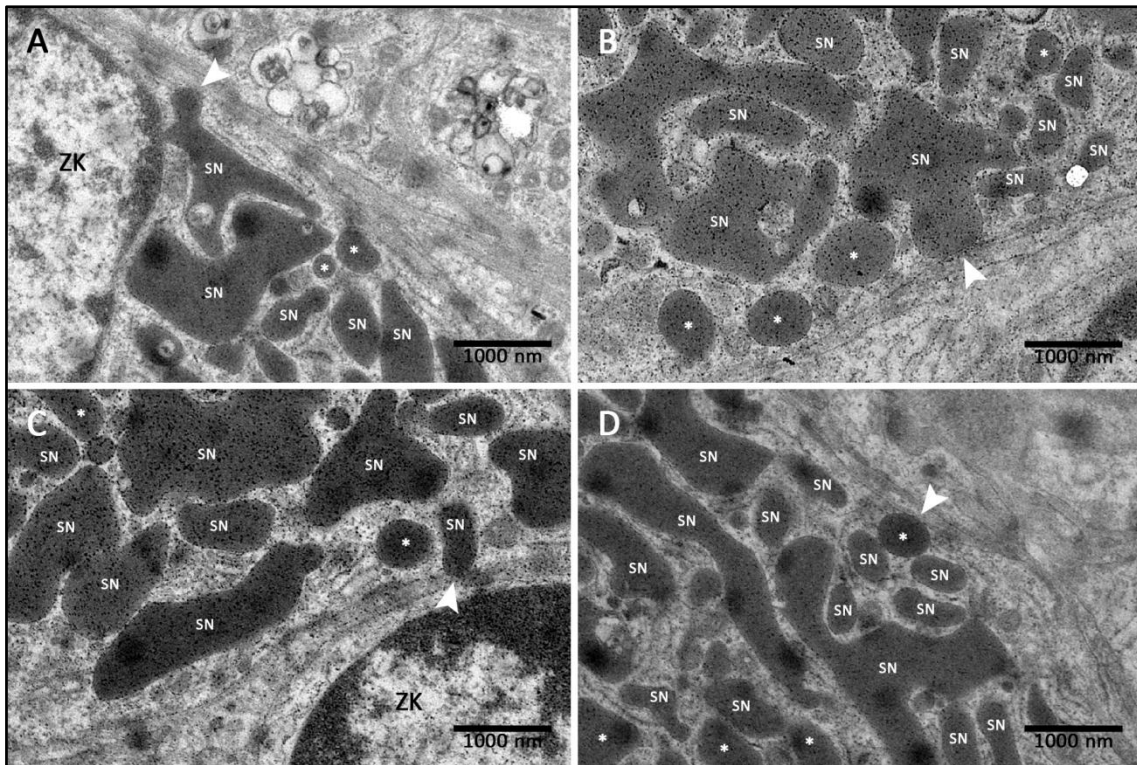
**Abb. 21: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)**

Der Zellkern ist gelblich und die Zellmembran transparent dargestellt. Im rekonstruierten Teilausschnitt befinden sich vier große Speichernetzwerke, die farblich voneinander abgegrenzt sind (violett, gelb, blau, rot). Diese Netzwerke nehmen einen Großteil des Zellvolumens ein.



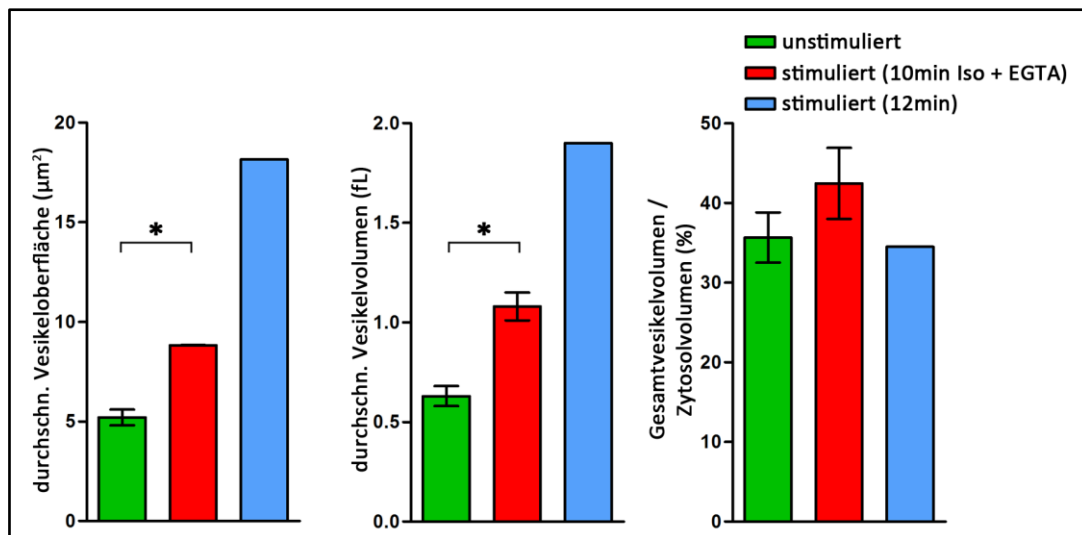
**Abb. 22: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)**

Reninvesikel sind grün, der Zellkern gelblich und die Zellmembran beige dargestellt. Es sind mehrere Exozytoseereignisse zu beobachten. Kontakte zwischen Vesikel- und Zellmembran traten sowohl bei kugelförmigen Vesikeln als auch bei großen Speichernetzwerken auf. Teilweise berührten sich die Vesikelmembran eines Speichernetzwerkes mit der Zellmembran an mehreren Kontaktstellen.



**Abb. 23: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6min Iso und 6 min Iso + EGTA)**

(SN = Vesikel erscheinen separiert, sind jedoch 3-dimensional betrachtet Teil eines großen Speichernetzwerkes; \* = Vesikel sind klassisch kugelförmig und nicht Teil eines Speichernetzwerkes; ZK = Zellkern). **A, B:** Es sind mehrere Kontakte von Vesikel- und Zellmembran zu erkennen (Pfeil). **C:** Kontakt eines Vesikels mit der Zellmembran und möglicher Austritt des Vesikelinhalts (Pfeil). **D:** Nicht nur netzwerkartige sondern auch kugelförmige Vesikel treten mit der Zellmembran in Kontakt (Pfeil).



**Abb. 24: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert, 10 min stimuliert, 12 min stimuliert)**

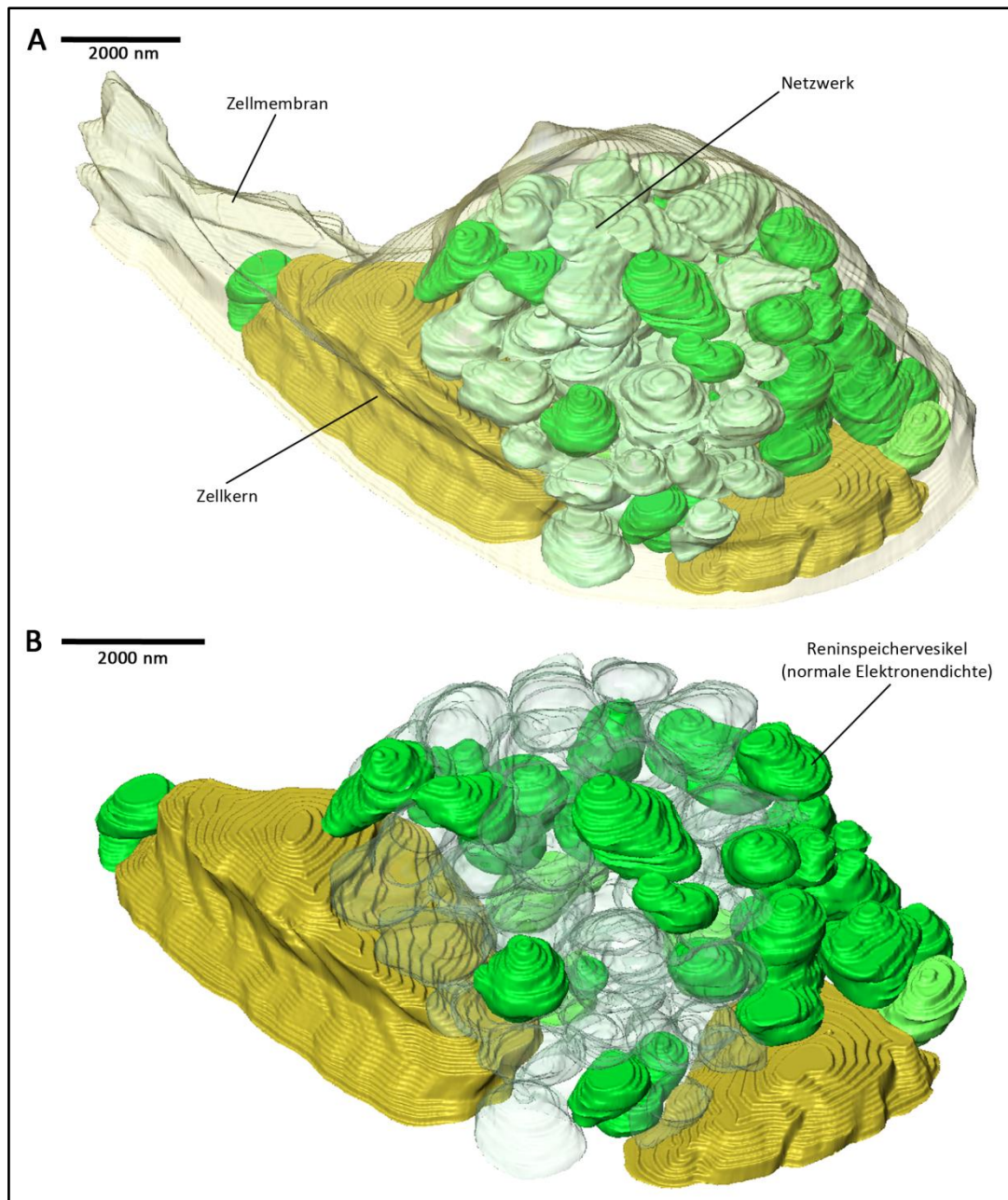
Verglichen werden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikelloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten JG-Zellen ( $n=2$ ) und von für eine Dauer von zehn Minuten mit 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA stimulierten JG-Zellen ( $n=2$ ) mit dem Mittelwerten der für eine Dauer von 12 Minuten stimulierten Zelle ( $n=1$ ). Sowohl die durchschnittliche Vesikelloberfläche als auch das durchschnittliche Vesikelvolumen der für 12 Minuten stimulierten JG-Zelle sind tendenziell im Vergleich zu unstimulierten und zehn Minuten stimulierten Zellen vergrößert. Beim Verhältnis von Gesamtvesikel- zu Zytosolvolumen konnte keine Abweichung festgestellt werden. (\*=signifikant,  $p<0,05$ )

erkennt man bei der für eine Dauer von 12 Minuten stimulierten JG-Zelle mehrere Abweichungen (Abb. 24). Da auch hier nur ein Teilausschnitt einer für 12 Minuten stimulierten Zelle rekonstruiert wurde, sind die im Graph dargestellten Abweichungen als Tendenz zu verstehen. Die durchschnittliche Vesikeloberfläche der zwölfminütig stimulierten Zelle ist mit  $18,15 \mu\text{m}^2$  gegenüber der Vesikeloberfläche der unstimulierten Zellen ( $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ ) mehr als verdreifacht, und gegenüber der Vesikeloberfläche der zehnminütig stimulierten Zellen ( $8,83 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ) mehr als verdoppelt. Analog ist das durchschnittliche Vesikelvolumen der zwölfminütig stimulierten Zelle mit 1,9 fL gegenüber dem Vesikelvolumen der unstimulierten Zellen ( $0,63 \pm 0,05 \text{ fL}$ ) mehr als verdreifacht und gegenüber dem Vesikelvolumen der zehnminütig stimulierten Zellen ( $1,08 \pm 0,07 \text{ fL}$ ) fast verdoppelt. Das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen lag bei der zwölfminütig stimulierten Zelle bei 34,5 % und zeigte, verglichen mit den Werten von unstimulierter Zellen ( $35,65 \pm 3,15 \%$ ) und zehnminütig stimulierter Zellen ( $42,45 \pm 4,45 \%$ ) keine große Abweichung.

#### Fünfzehnminütige Stimulation der Reninsekretion:

Schließlich wurden sehr stark stimulierte JG-Zellen analysiert. Die Stimulation erfolgte durch 15-minütige Zugabe von 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA ins Perfusat. Es wurden Teilausschnitte von zwei repräsentativen Zellen rekonstruiert. Betrachtet man die 3-dimensionalen Rekonstruktionen sehr stark stimulierter JG-Zellen, so fällt auf, dass nur noch verhältnismäßig wenige normale, in der gezeigten Rekonstruktion dunkelgrün dargestellte, elektronendichte Reninspeichervesikel in der Zelle vorhanden sind. Darüber hinaus existieren einige wenige, oben bereits beschriebene Vesikel mit verminderter Elektronendichte. Den Großteil des Zellvolumens nimmt jedoch ein nicht elektronendichtes, zusammenhängendes Netzwerk ein, das anscheinend aus teilweise entleerten, miteinander fusionierten Vesikeln besteht und in der gezeigten 3-dimensionalen Rekonstruktion hellgrün dargestellt ist. Dieses Netzwerk steht nicht mit Vesikeln normaler oder verminderter Elektronendichte in Kontakt (Abb. 25A, B). Desweiteren konnten in den rekonstruierten Teilausschnitten der JG-Zellen keine Hinweise auf Exozytoseereignisse beobachtet werden. Weder die Reninspeichervesikel mit normaler und verminderter Elektronendichte, noch das Netzwerk stehen mit der

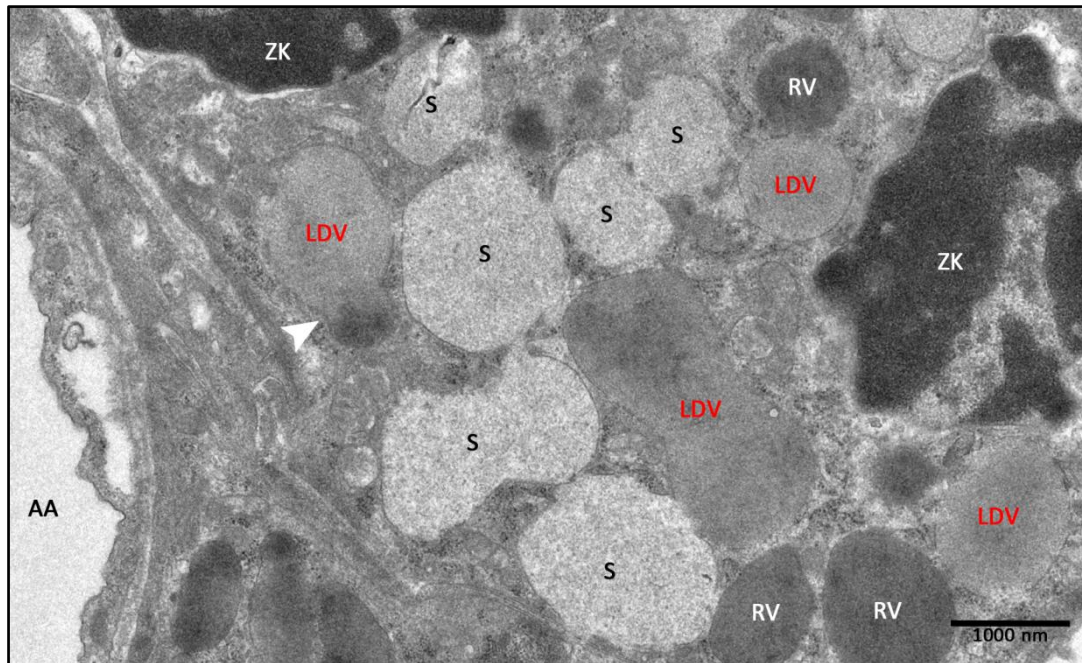




**Abb. 25: 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 15 min stimuliert mit Iso + EGTA)**

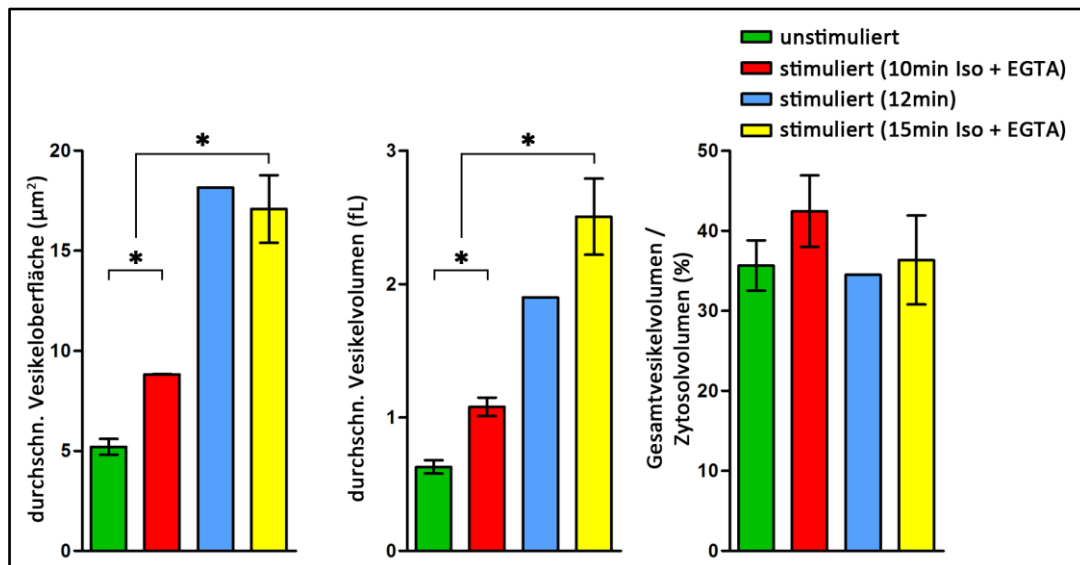
**A:** Elektronendichte Reninspeichervesikel sind grün, das nicht elektronendichte Netzwerk ist hellgrün, der Zellkern braun und die Zellmembran transparent dargestellt. Das Netzwerk besteht anscheinend aus miteinander fusionierten Einzelvesikeln und nimmt einen Großteil des Zellvolumens ein und steht weder mit der Zellmembran noch mit den elektronendichten Reninspeichervesikeln in Kontakt. **B:** Die Zellmembran ist ausgeblendet und das Netzwerk transparent dargestellt. Man kann erkennen, dass nur noch verhältnismäßig wenige elektronendichte Reninspeichervesikel in der JG-Zelle existieren.

Zellmembran in Kontakt. Auch auf einer EM-Aufnahme eines Ultradünnschnitts der 15 Minuten stimulierten JG-Zellen ist das kaum elektronendichte Netzwerk erkennbar (Abb. 26). Zusätzlich dazu erkennt man Vesikel mit geringer und normaler Elektronendichte. In einigen Fällen scheinen Vesikel mit geringer und normaler Elektronendichte zu verschmelzen, woraus Strukturen mit unregelmäßig verteilter



**Abb. 26: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 15 min stimuliert mit Iso + EGTA)**

Die Zelle enthält elektronenoptisch dichte, reninhaltige Speichervesikel mit klassischer runder Form (RV). Zusätzlich dazu ist der Zellkern (ZK) erkennbar. Auffällig sind mehrere Vesikel mit geringer Elektronendichte (low density vesicles – LDV) und ein großes, nicht elektronendichtes Speichernetzwerk (S), welches aus einer großen Zahl von zusammenhängenden Vesikeln zu bestehen scheint. Dieses Netzwerk steht nicht mit Vesikeln normaler oder verminderter Elektronendichte in Kontakt.



**Abb. 27: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert, 10 min stimuliert, 12 min stimuliert, 15 min stimuliert)**

Verglichen werden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikeloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten JG-Zellen ( $n=2$ ), von für eine Dauer von zehn Minuten mit 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA stimulierten JG-Zellen ( $n=2$ ) und der für eine Dauer von 12 Minuten (6min Iso, 6min Iso+EGTA) stimulierten Zelle ( $n=1$ ) mit den Mittelwerten der für eine Dauer von 15 Minuten stimulierten Zellen ( $n=2$ ). Die Durchschnittliche Vesikeloberfläche und das durchschnittliche Vesikelvolumen verdoppeln sich bei fünfzehnminütiger Stimulation verglichen mit zehnminütiger Stimulation und sind vergleichbar mit den Werten der unstimulierten Zelle mehr als dreimal so groß. Tendenziell ist die durchschnittliche Vesikeloberfläche der 15 Minuten stimulierten Zelle mit dem Wert der 12 Minuten stimulierten Zelle vergleichbar, während das durchschnittliche Vesikelvolumen vergrößert ist. Es konnten bei den verschiedenen Stimulationsstufen keine Unterschiede in Bezug auf das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen festgestellt werden (\*=signifikant,  $p<0,05$ ).

Elektronendichte resultieren (Abb. 26, Pfeil). Die Berechnung der Vesikelvolumina und –oberflächen der für eine Dauer von 15 Minuten stimulierten JG-Zellen ergaben eine signifikante Vergrößerung dieser Werte, sowohl im Vergleich zu unstimulierten JG-Zellen als auch zu Zellen, welche für zehn minuten stimuliert wurden (Abb. 27). So ist die durchschnittliche Vesikeloberfläche mit  $17,09 \pm 1,69 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zur der der unstimulierten Zellen ( $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ ) mehr als verdreifacht, im Vergleich zu der Vesikeloberfläche der zehnminütig stimulierten Zellen ( $8,83 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ) mehr als verdoppelt, und vergleichbar mit der Vesikeloberfläche der zwölfminütig stimulierten Zelle ( $18,15 \mu\text{m}^2$ ). Das durchschnittliche Vesikelvolumen der fünfzehnminütig stimulierten Zellen ist mit  $2,51 \pm 0,29 \text{ fL}$  im Vergleich zu dem Vesikelvolumen der unstimulierten Zellen ( $0,63 \pm 0,05 \text{ fL}$ ) mehr als vervierfacht, im Vergleich zu dem Vesikelvolumen der zehnminütig stimulierten Zellen ( $1,08 \pm 0,07 \text{ fL}$ ) mehr als verdoppelt und verglichen mit dem Vesikelvolumen der zwölfminütig stimulierten Zelle ( $1,9 \text{ fL}$ ) fast um ein Drittel vergrößert. Beim Verhältnis von Gesamtvesikel- zu Zytosolvolumen der fünfzehnminütig stimulierten Zelle ( $36,35 \pm 5,55 \%$ ) konnte, verglichen mit den Werten der anderen Stimulationsstufen keine signifikante Abweichung beobachtet werden.

## 4.2. Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Beige-Maus

Wie bereits erwähnt, deuten viele Studien daraufhin, dass die JG-Zellen der Niere Renin in sogenannten sekretorischen Lysosomen speichern. Es wurden bereits mehrere lysosomenspezifische Proteasen in den Reninvesikeln nachgewiesen und es existieren mehrere Studien sowohl über abnormal vergrößerte Lysosomen in Melanozyten und hämatopoietischen Zellen als auch über morphologisch veränderte Reninspeichervesikel in JG-Zellen der Beige (*C57BL/6J-Lyst<sup>bg-J</sup>/J*) Maus. Bei diesem Knockout ist das LYST-Protein (lysosomal trafficking protein) deletiert, welches an der korrekten Ausbildung von Lysosomen beteiligt ist. Aus diesem Grund war es naheliegend, die Vesikelmorphologie von JG-Zellen der Beige-Maus in unstimuliertem und stimuliertem Zustand anhand vom 3-dimensionalen Teilrekonstruktionen zu

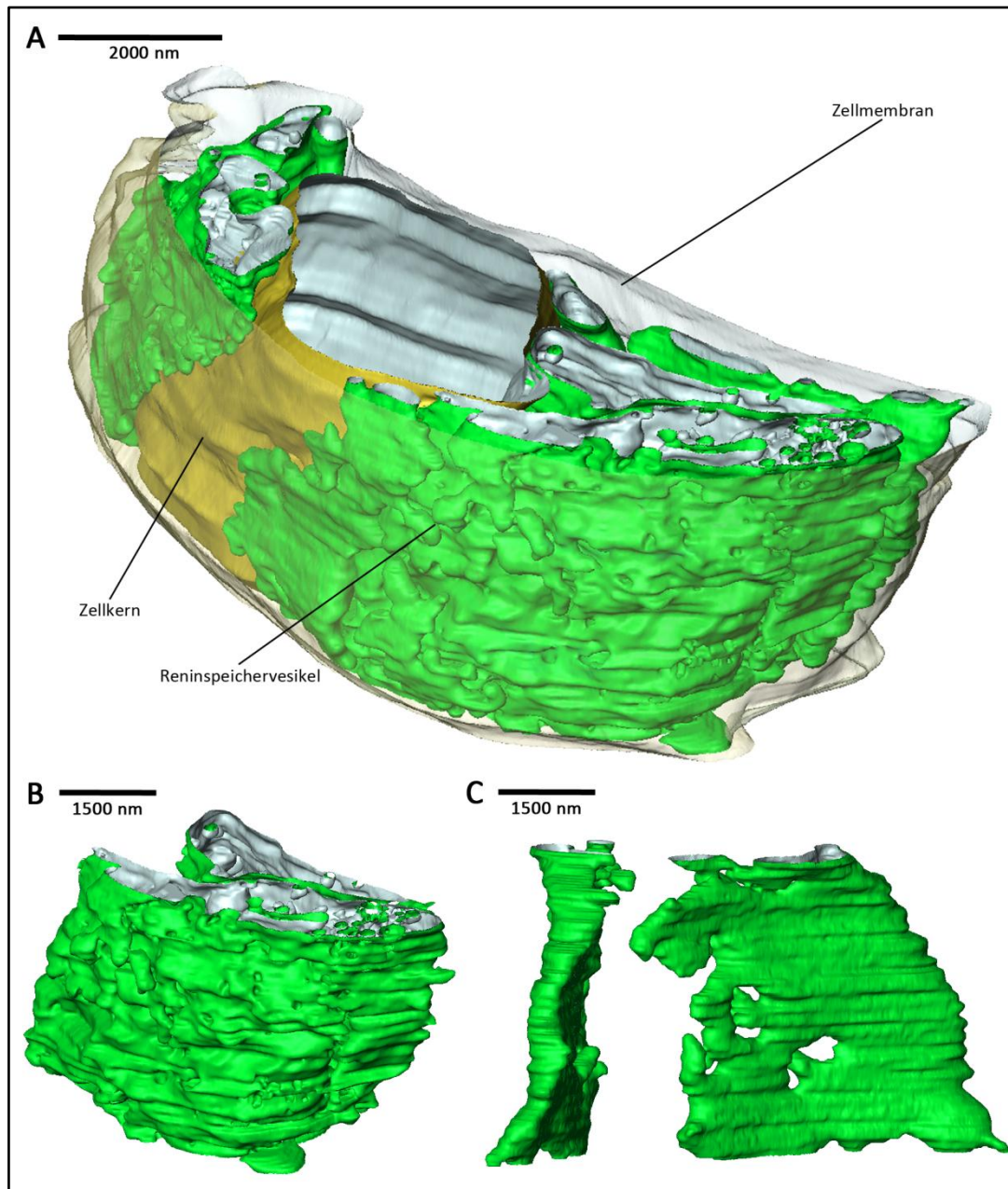
untersuchen. Wie schon bei Wildtyp-Mäusen konnte pro rekonstruiertem Teilausschnitt mit Hilfe von Amira das durchschnittliche Vesikelvolumen (in nL), die durchschnittliche Vesikelloberfläche (in  $\mu\text{m}^3$ ) und das Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen (in %) errechnet werden.

#### **4.2.1. Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen einer Beige-Maus**

Die Nieren wurden wie schon bei den Wildtyp-Mäusen nach der IPN-Technik freipräpariert, mit PBS bei konstantem Druck über die A. renalis gespült und anschließend sofort durch Perfusionsfixierung mit 2 %-iger Glutaraldehydlösung für die EM-Präparation vorbereitet. Es erfolgte zunächst keine pharmakologische Stimulation der Reninsekretion, damit die Morphologie der Vesikel im Ruhezustand untersucht werden konnte. Nach erfolgter EM-Präparation wurde eine Schnittserie von bis zu 100 70 nm dicken Ultradünnschnitten angefertigt. Eine JG-Zelle wurde gesucht und bei 3800-facher Vergrößerung abfotografiert. Aus den entstandenen EM-Aufnahmen konnte mithilfe des Rekonstruktionsprogramms Amira ein 3-dimensionaler Teilausschnitt einer repräsentativen Zelle erstellt werden. Betrachtet man die gesamte Teilrekonstruktion der unstimulierten JG-Zelle der Beige-Maus, werden im Vergleich zu unstimulierten Wildtyp-Zellen signifikante Unterschiede in der Vesikelmorphologie deutlich. Während in den Wildtyp-Zellen neben den netzwerkartigen Vesikeln vermehrt kugelförmige Vesikel existieren, sind diese in der JG-Zelle der Beige-Maus nur noch vereinzelt vorhanden (Abb. 28A). Es existieren nur sehr wenige, aber sehr große Speichervesikel. Diese sind weniger netzwerkartig, als vielmehr unregelmäßig geformt mit falten- oder bläschenartigen Einschlüssen und Einstülpungen (Abb. 28B). Darüber hinaus existieren auch große flache fladenartige Vesikel ohne Einstülpungen (Abb. 28C). Am rekonstruierten Teilausschnitt konnten keine Exozytoseereignisse beobachtet werden. Auch auf der EM-Aufnahme eines Ultradünnschnitts der JG-Zelle wird die veränderte Vesikelmorphologie deutlich. Das Zellvolumen ist größtenteils mit elektronenoptisch dichten und sehr großen, unregelmäßig geformten oder fladenartigen Vesikel aufgefüllt. Die unregelmäßig geformten, aber nicht die fladenartigen Vesikel besitzen zahlreiche falten- oder bläschenartige Einschlüsse und Einstülpungen (Abb. 29). Auch auf 2-dimensionaler Ebene konnten keine Kontakte von



Vesikel- und Zellmembran beobachtet werden. Vergleicht man die Werte für durchschnittliches Vesikelvolumen, durchschnittliche Vesikeloberfläche und Verhältnis

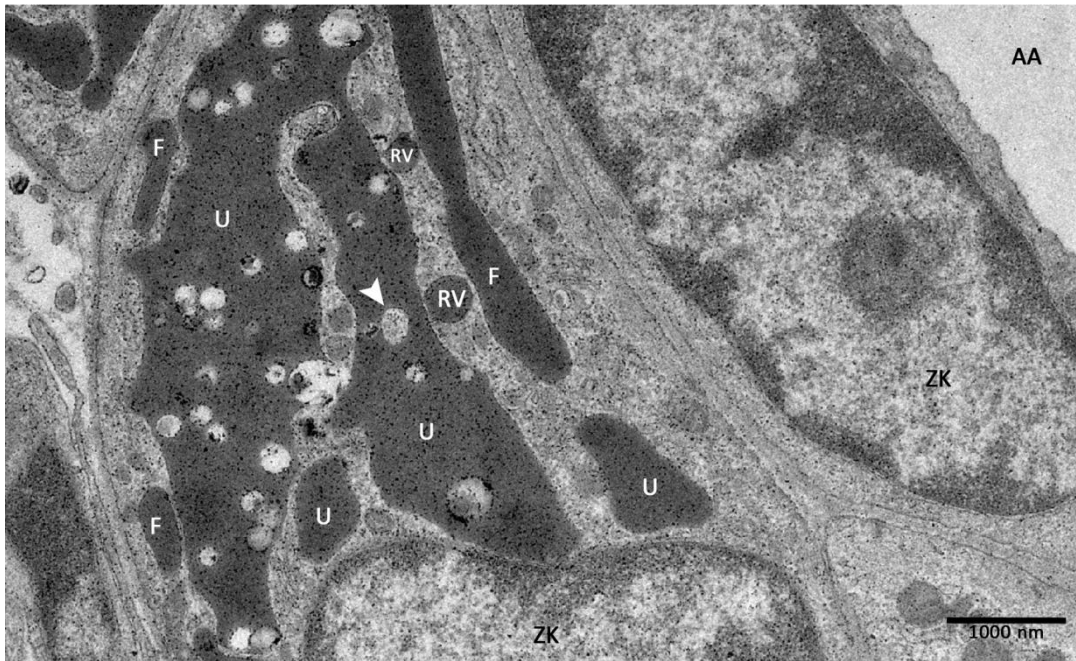


**Abb. 26: 3-dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Beige, unstimuliert)**

Der Zellkern ist gelblich, die Reninspeichervesikel grün und die Zellmembran transparent dargestellt. **A:** Gesamtübersicht des Teilausschnitts. Die Morphologie der Reninspeichervesikel unterscheidet sich deutlich von der unstimulierten Wildtyp-Zellen. Es existieren wenige kleine kugelförmige und sehr wenige, aber dafür sehr große Reninspeichervesikel. **B:** Einige Reninspeichervesikel sind sehr groß und besitzen zahlreiche bläschenartige oder faltenartige Einstülpungen, was auch ihre Oberfläche enorm vergrößert. **C:** Andere Reninspeichervesikel weisen keine Einstülpungen auf, sind aber selbst von flacher, fladenartiger Form.

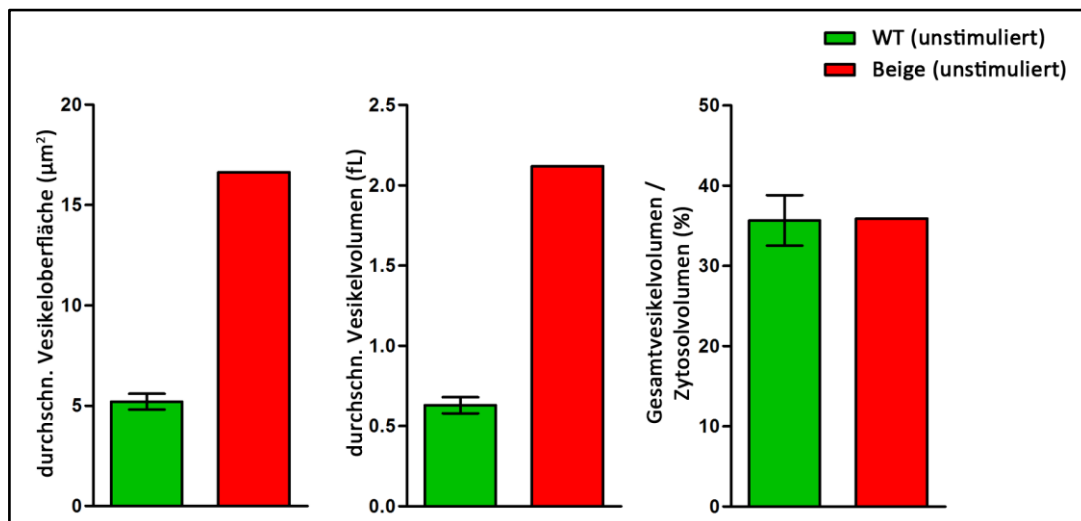
Von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen, erkennt man deutliche Abweichungen (Abb. 30). Da auch hier nur ein Teilausschnitt einer unstimulierten Zelle einer Beige-Maus rekonstruiert wurde, sind die im Graph dargestellten Abweichungen als Tendenz zu verstehen. Verglichen mit dem durchschnittlichen Vesikelvolumen ( $0,63 \pm 0,05$  fL)





**Abb. 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Beige, unstimuliert)**

Es sind nur noch wenige kugelförmige Reninspeichervesikel (RV) vorhanden. Das Zellvolumen ist größtenteils mit einigen wenigen, dafür aber sehr großen, unregelmäßig geformten Vesikeln (U) und fladenartigen Vesikeln (F) angefüllt. Die unregelmäßig geformten Vesikel besitzen zahlreiche falten- oder bläschenartige Einstülpungen und Einschlüsse (Pfeil). Es konnten keine Kontakte von Vesikel- und Zellmembran beobachtet werden.



**Abb. 30: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert, Beige unstimuliert)**

Verglichen wurden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikelloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten JG-Zellen einer Wildtyp-Maus ( $n=2$ ) und der unstimulierten JG-Zelle einer Beige-Maus ( $n=1$ ). Sowohl die durchschnittliche Vesikelloberfläche als auch das durchschnittliche Vesikelvolumen der Zelle der Beige-Maus sind im Vergleich zu den Werten der Wildtyp-Zelle vergrößert, während das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen keine Abweichung zeigt.

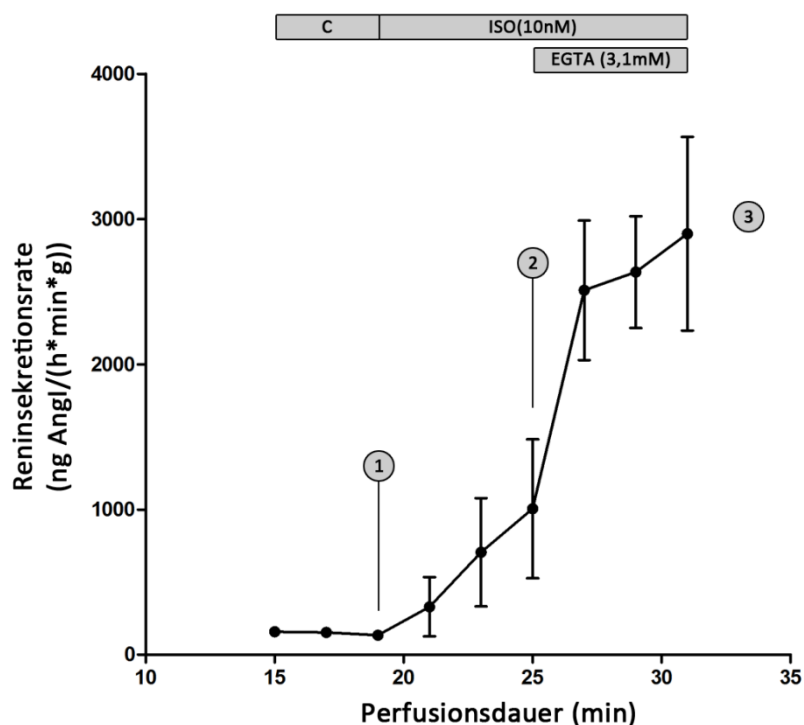
und der durchschnittlichen Vesikelloberfläche ( $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ ) der unstimulierten Wildtyp-Zellen ist das durchschnittliche Vesikelvolumen der Beige-Zelle mit 2.12 fL um mehr als das 3-fache erhöht, und ihre durchschnittliche Vesikelloberfläche ist mit  $16,64 \mu\text{m}^2$  ebenfalls um mehr als das 3-fache erhöht. Das Verhältnis von Gesamt-

vesikelvolumen zu Zytosolvolumen zeigt mit 35,9 % im Vergleich zum Wert der unstimulierten Wildtyp-Zellen ( $35,65 \pm 3,15$  %) keine signifikante Abweichung.

#### 4.2.2. Untersuchung von stimulierten JG-Zellen einer Beige-Maus

##### 4.2.2.1. Messung der Reninsekretionsrate unter kontrollierten Bedingungen

Wie schon bei Wildtyp-JG-Zellen geschehen, wurde der venöse Ausfluss der für eine Dauer von 12 Minuten stimulierten Nieren von Beige-Mäusen alle drei Minuten für jeweils eine Minute gesammelt, die Reninkonzentration mittels RIA vermessen und



**Abb. 27: IPN-Protokoll von Beige-Nieren (n=3)**

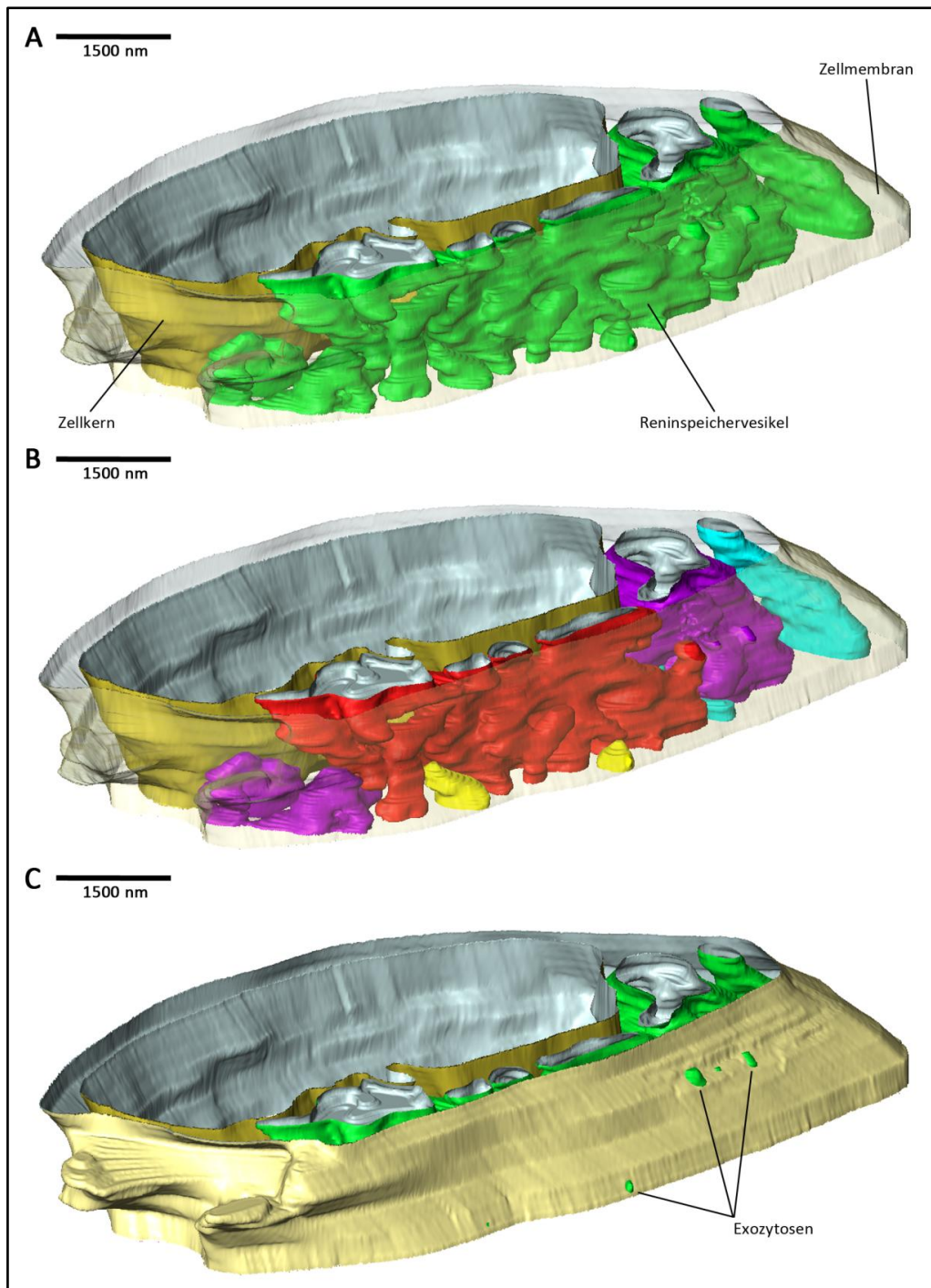
Bei vergleichbarer Stimulation konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Reninsekretionsraten von Wildtyp-Nieren festgestellt werden. Nach einer Stabilisierungsdauer von 15 Minuten wurden Proben zur Bestimmung der basalen Reninsekretionsrate entnommen (Kontrollabschnitt C). Nach Beendigung des Kontrollabschnitts (Zeitpunkt 1) erfolgte die Stimulation durch Hinzufügen von 10nM Isoproterenol zum Perfusat, was zu einer ca. 5-fachen Erhöhung der Reninsekretionsrate führte. Sechs Minuten nach Beginn der Stimulationsphase (Zeitpunkt 2) wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration durch Hinzufügen von 3,1 mM EGTA ins Perfusat verringert, was verglichen mit dem Basalwert zu einer ca. 20-fachen Erhöhung der Reninsekretionsphase führte. Ungefähr sechs Minuten nach dem Hinzufügen von EGTA (Zeitpunkt 3) wurde die Niere fixiert.

daraus die Reninsekretionsrate berechnet. Die Reninsekretionsraten von Wildtyp- und Beige-Nieren unterscheiden sich bei gleichen Stimulationsbedingungen nicht signifikant (Abb. 31). Die Stimulation erfolgte durch Hinzufügen von 10 nM Isoproterenol zum Perfusat, was zu einer ca. 5-fachen Erhöhung der Renin-

sekretionsrate führte. Sechs Minuten nach Beginn der Stimulationsphase wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration durch Hinzufügen von 3,1 mM EGTA ins Perfusat verringert, was verglichen mit dem Basalwert zu einer ca. 20-fachen Erhöhung der Reninsekretionsphase führte.

#### **4.2.2.2. Stimulation mit Isoproterenol und EGTA**

Als nächstes wurde eine 3-dimensionale Rekonstruktion einer stimulierten JG-Zelle einer Beige-Maus angefertigt. Zu diesem Zweck wurde die Niere der Beige-Maus wie oben beschrieben freipräpariert und über die A. renalis unter konstantem Druck mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Stimulation erfolgte, wie schon bei der zwölfminütigen Stimulation der Wildtyp-Niere, durch Hinzufügen von 10 nM Isoproterenol für eine Dauer von sechs Minuten, und dann von 10 nM Isoproterenol und 3,1 mM EGTA für eine Dauer von weiteren sechs Minuten ins Perfusat. Fixierung und Einbettung der Niere erfolgten wie bereits beschrieben. Es wurde ein Teilausschnitt einer repräsentativen stimulierten JG-Zelle rekonstruiert (Abb. 32A). Die Vesikelmorphologie der stimulierten JG-Zelle der Beige Maus unterscheidet sich kaum von der der unstimulierten Zelle. Es sind große unregelmäßig geformte und fladenartige Vesikel zu erkennen, während nur wenige kleine kugelförmige Vesikel existieren. Anders als bei der unstimulierten Beige-Zelle sind hier keine bläschenförmigen Einschlüsse und Einstülpungen zu erkennen. Das Zellvolumen wird größtenteils von einigen wenigen, dafür aber sehr großen Vesikeln ausgefüllt (Abb. 32B). Im Gegensatz zur unstimulierten JG-Zelle der Beige Maus sind bei der stimulierten Zelle mehrere Kontakte von Vesikel- und Zellmembran erkennbar (Abb. 32C). Vergleicht man die EM-Aufnahmen der stimulierten Beige-Zelle mit denen der unstimulierten Zelle, so erkennt man ebenfalls unregelmäßig geformte und fladenartige, elektronenoptisch dichte Reninspeichervesikel. Diese enthalten im Gegensatz zu den Vesikeln der unstimulierten Zelle keine bläschenartigen Einschlüsse. Desweiteren sind auch hier Kontakte der Vesikelmembran mit der Zellmembran erkennbar. In mehreren Fällen konnte ein Austritt von Vesikelinhalt beobachtet werden (Abb. 33). Auch bei dieser Teilrekonstruktion wurden die Werte für durchschnittliches Vesikelvolumen, durchschnittliche Vesikeloberfläche und Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen berechnet und sowohl mit den

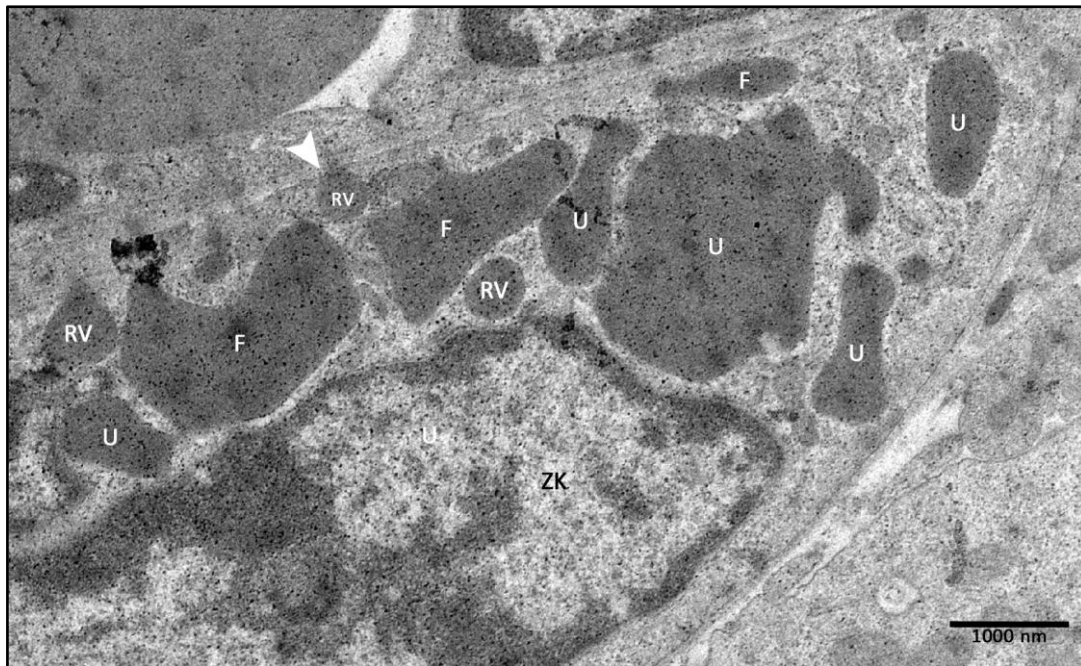


**Abb. 28: 3-dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Beige, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)**

**A:** Der Zellkern ist gelblich, die Reninspeichervesikel grün und die Zellmembran transparent dargestellt. Es sind kaum Unterschiede bezüglich der Vesikelmorphologie im Vergleich zur unstimulierten Zelle zu erkennen, jedoch existieren keine bläschenartigen Einschlüsse in den Vesikeln. **B:** Einzelne Reninvesikel sind verschiedenfarbig dargestellt. Man erkennt, dass das Zellvolumen zum größten Teil von einigen wenigen, großen Vesikeln ausgefüllt wird. **C:** Es wurden mehrere Kontakte von Vesikel- und Zellmembran beobachtet

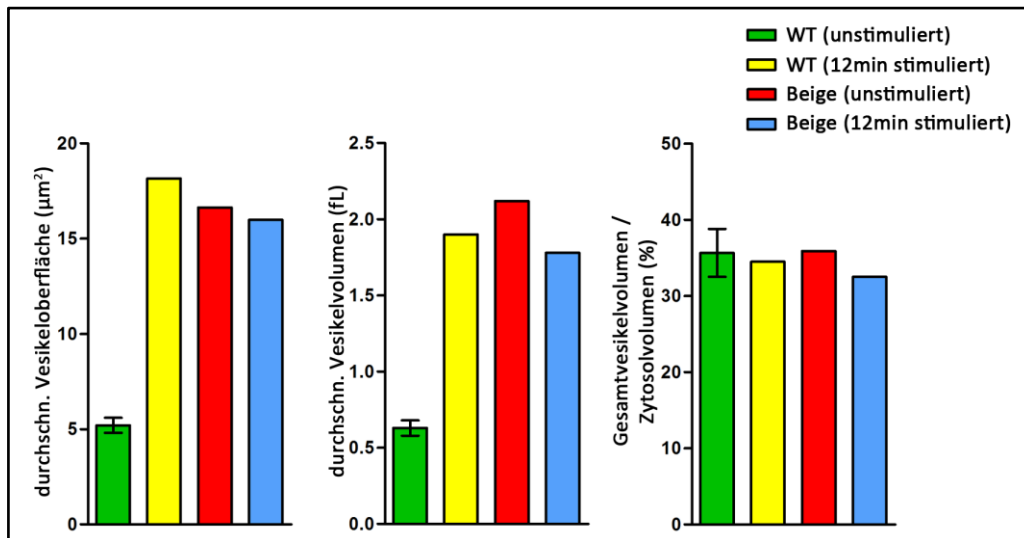
entsprechenden Werten der unstimulierten Zellen der Beige-Maus, als auch mit den Werten der unstimulierten und stimulierten Zellen der Wildtyp-Maus verglichen (Abb. 34). Da von allen außer den unstimulierten Wildtyp-Zellen nur ein Teilausschnitt





**Abb. 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Beige, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)**

Es sind nur noch wenige kugelförmige Reninspeichervesikel (RV) vorhanden. Den größten Teil des Zellvolumens nehmen einige wenige, dafür aber sehr große, unregelmäßig geformte Vesikel (U) und fladenartigen Vesikel (F) ein. Es konnten mehrere Kontakte von Vesikel- und Zellmembran, verbunden mit einem Austritt von Vesikelinhalt, beobachtet werden (Pfeil).



**Abb. 30: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 12 min stimuliert, Beige unstimuliert und 12 min stimuliert)**

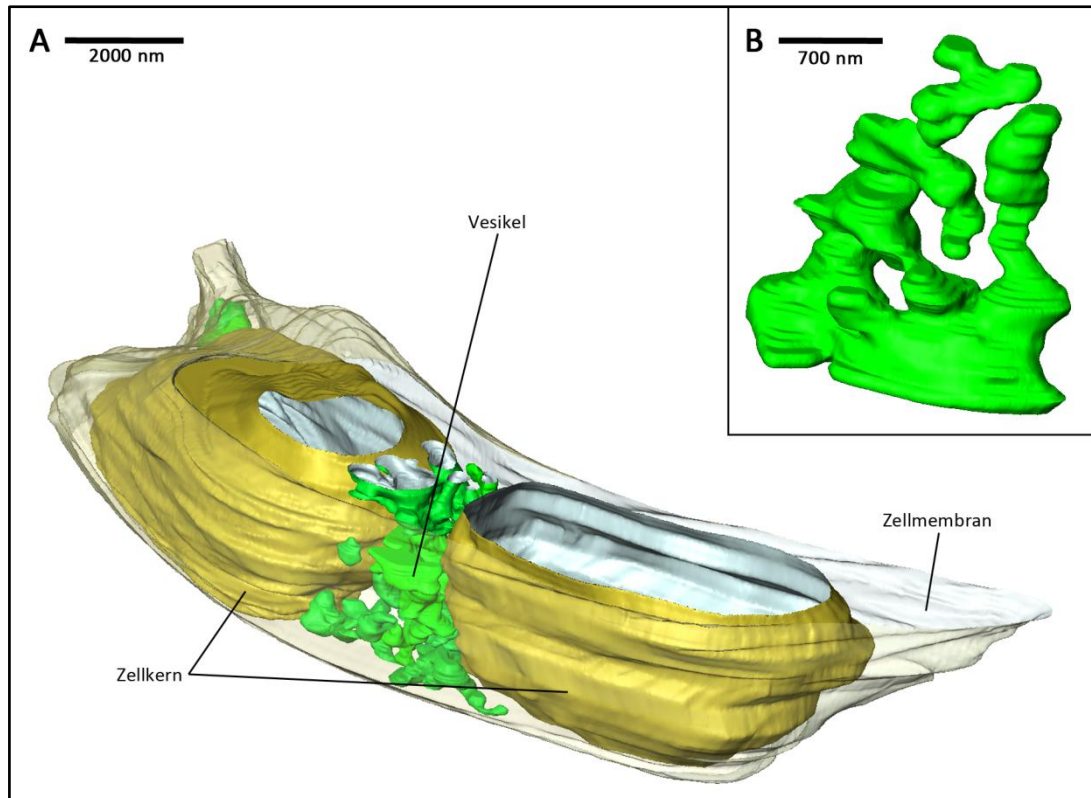
Verglichen wurden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikelloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen von für eine Dauer von 12 Minuten stimulierten und unstimulierten Wildtyp-JG-Zellen und Beige-JG-Zellen (WT unstimuliert:  $n=2$ ; Andere:  $n=1$ ). Durchschnittliches Vesikelvolumen und durchschnittliche Vesikelloberfläche einer Wildtyp-Zelle vergrößern sich bei Stimulation, während bei Stimulation einer Beige-Zelle kein vergleichbarer Effekt eintritt. Das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen von Wildtyp-Zellen und von Beige-Zellen bleibt unter diesen Stimulationsbedingungen ebenfalls unverändert.

rekonstruiert wurde sind die im Graph dargestellten Abweichungen als Tendenz zu verstehen. Während durchschnittliche Vesikelloberfläche und –volumen einer Wildtyp-JG-Zelle bei einer zwölfminütigen Stimulation tendenziell zunehmen, kommt es bei der

zwölfminütigen Stimulation der Beige-Zelle nicht zu einem solchen Effekt. Die durchschnittliche Vesikeloberfläche der zwölfminütig stimulierten Beige-Zelle ist mit  $15,98 \mu\text{m}^2$  mit der durchschnittlichen Vesikeloberfläche der unstimulierten Beige-Zelle ( $16,64 \mu\text{m}^2$ ) vergleichbar und das durchschnittliche Vesikelvolumen ist mit 1,79 fL gegenüber dem durchschnittlichen Vesikelvolumen der unstimulierten Beige-Zelle (2,12 fL) ebenfalls vergleichbar. Auch das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen zeigt bei der zwölfminütig stimulierten Beige-Zelle mit 32,5 % keine signifikante Abweichung vom Wert der unstimulierten Zelle (35,9%).

### **4.3. Morphologie der Speichervesikel in JG-Zellen einer Ren-1d-Cre/Cre-Maus**

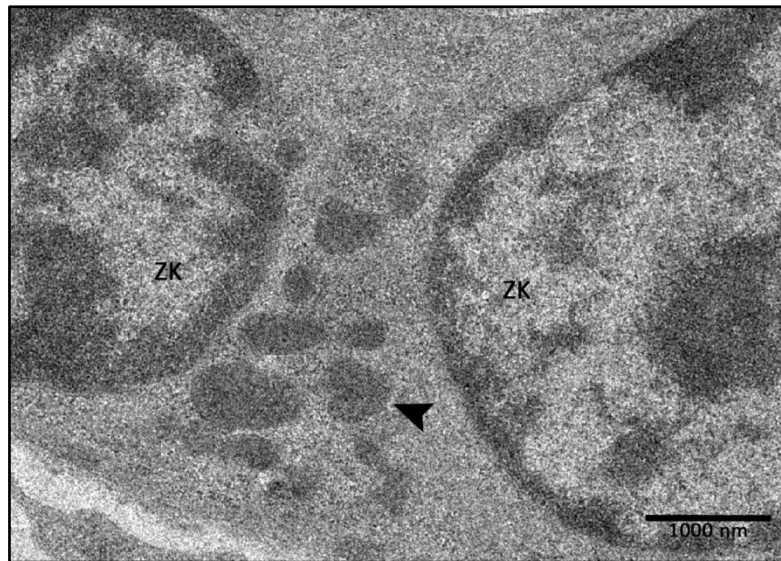
Wie bereits erwähnt, existieren Mausstämme, welche zwei Reningene tragen (z.B. 129SV, Swiss), die als Ren-1d und Ren-2 bezeichnet werden. Während Ren-1-Proteine glykosyliert, in Dense-Core-Vesikel transportiert und bis zur regulierten Sekretion gespeichert werden, werden Ren-2-Proteine nicht glykosyliert und konstitutiv in klaren Vesikeln sezerniert. Ren-2 spielt demzufolge keine Rolle bei der regulierten Sekretion. Es war daher von Interesse, die Vesikelmorphologie von JG-Zellen von Ren-1d-Cre/Cre-Mäusen zu untersuchen. Diese Ren-1d Knockout Mäuse mit 129SV-Hintergrund exprimieren kein funktionelles Ren-1-Gen, sondern ausschließlich Ren-2. Die Nieren wurden wie schon bei den Wildtyp-Mäusen nach der IPN-Technik freipräpariert, mit PBS bei konstantem Druck über die A. renalis gespült und anschließend sofort durch Perfusionsfixierung mit 2 %-iger Glutaraldehydlösung für die EM-Präparation vorbereitet. Anschließend erfolgte die Präparation und Bildaquisition der JG-Zellen mit dem Transmissionselektronenmikroskop. Es folgte die Rekonstruktion eines Teilausschnitts einer repräsentativen Zelle. Eine Analyse der 3-dimensionalen Teilrekonstruktion von Ren-1d-Cre/Cre-JG-Zellen zeigte, dass auch diese Zellen vesikuläre Speicherstrukturen besitzen (Abb. 35A). Die Morphologie dieser Vesikel ähnelt der von Wildtyp-JG-Zellen. Es existieren sowohl kleine kugelförmige, als auch netzwerkartig erweiterte Vesikel (Abb. 35B). Dabei ist auffallend, dass die Vesikel der JG-Zellen des Ren-1d Knockouts im Vergleich zu Vesikeln von Wildtyp-JG-Zellen



**Abb. 31: 3-dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Ren-1d-Cre/Cre, unstimuliert)**

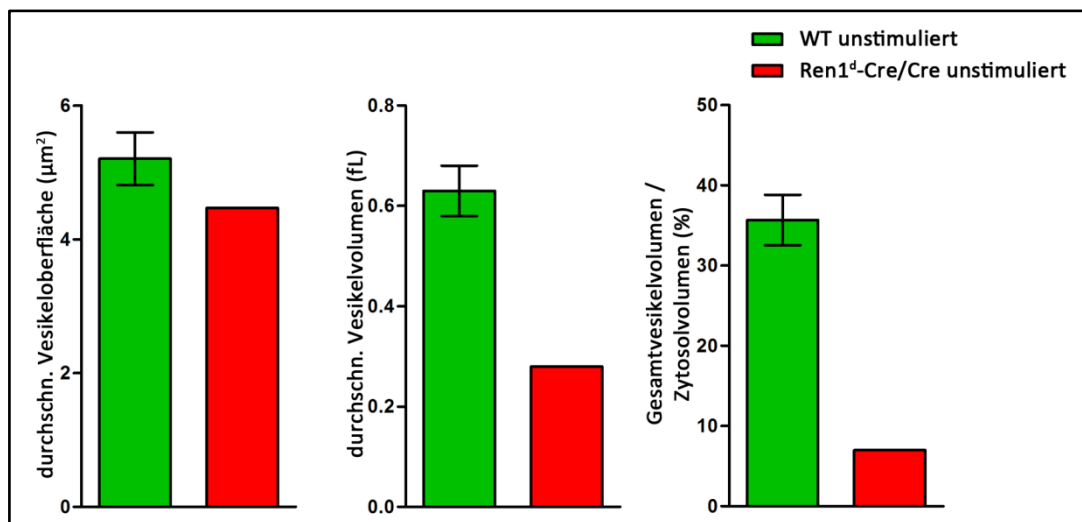
Der Zellkern ist braun und elektronenoptisch dichte Vesikelstrukturen grün dargestellt. **A:** Auch JG-Zellen von Ren-1d Knockout Mäusen enthalten elektronenoptisch dichte, vesikuläre Speicherstrukturen, welche aber im Vergleich zu den Reninspeichervesikeln in Wildtyp-JG-Zellen deutlich verkleinert sind. **B:** Abgesehen von ihrer Größe unterscheiden sich die Vesikel nicht von Reninspeichervesikeln von Wildtyp-JG-Zellen, es existieren zahlreiche kugelförmige und netzwerkartig erweiterte Strukturen.

deutlich verkleinert erscheinen. Die kleinen elektronendichten Speicherstrukturen sind auf einer TEM-Aufnahme ebenfalls gut zu erkennen (Abb. 36). Die Elektronendichte der Speicherstrukturen scheint geringer zu sein als bei Reninspeichervesikeln von Wildtyp-JG-Zellen. Weder in den 3-dimensionalen Teilrekonstruktionen noch auf TEM-Aufnahmen dieses Genotyps konnten Exozytoseereignisse, wie z.B. Kontakte von Vesikel- und Zellmembran, beobachtet werden. Die für diesen Teilausschnitt berechneten Werte für durchschnittliches Vesikelvolumen und Verhältnis von gesamtem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen bestätigen die an der 3-dimensionalen Rekonstruktion gemachten Beobachtungen (Abb. 37). Da jedoch, im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen, für diese Berechnung nur eine einzige Teilrekonstruktion zur Verfügung stand, können nur tendenzielle Aussagen getroffen werden. Das durchschnittliche Vesikelvolumen der Ren-1d-Cre/Cre Maus ist mit 0,28 fL gegenüber dem Durchschnittswert der Wildtyp-Zellen ( $0,63 \pm 0,05$  fL) um mehr als die Hälfte verringert. Die durchschnittliche Vesikeloberfläche zeigt mit  $4,47 \mu\text{m}^2$  nur eine vernachlässigbare Abweichung gegenüber dem Durchschnittswert der Wildtyp-Zellen



**Abb. 32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Ren-1d-Cre/Cre, unstimuliert)**

Es sind vesikuläre, elektronenoptisch dichte Strukturen zu erkennen (Pfeil), die im Vergleich zu Reninspeichervesikeln einer Wildtyp-JG-Zelle deutlich kleiner und weniger elektronendicht sind.



**Abb. 33: Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und Ren-1d-Cre/Cre unstimuliert)**

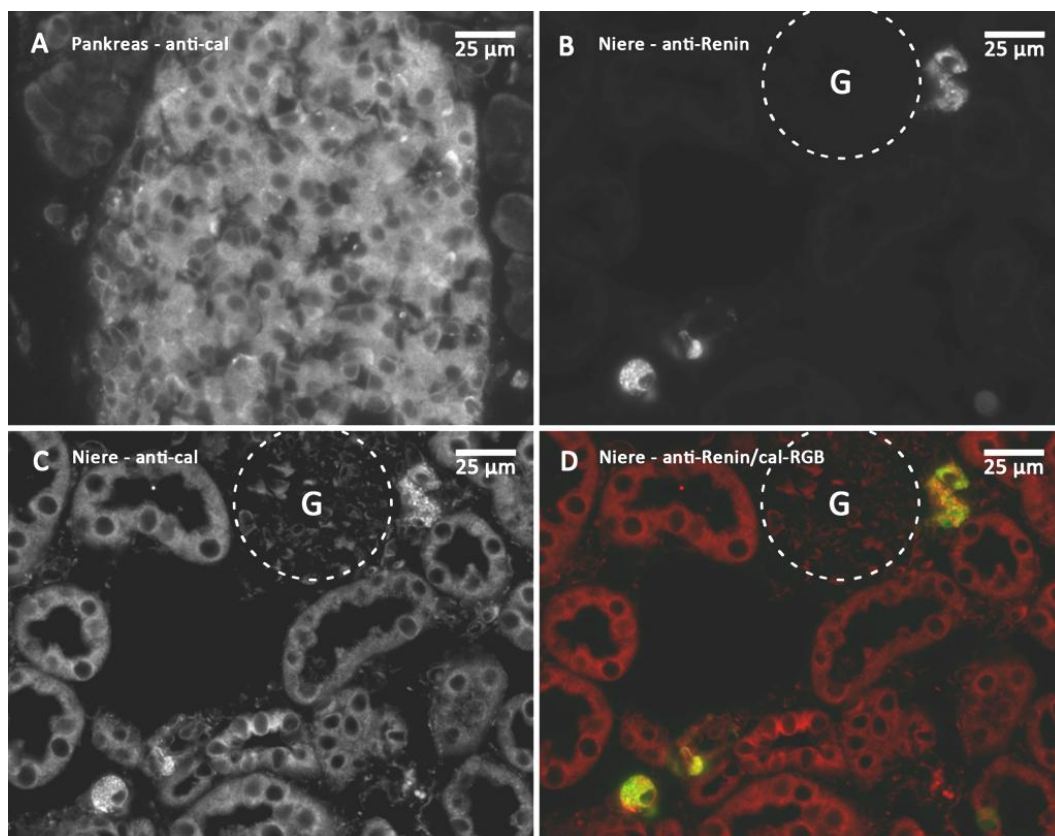
Verglichen wurden die Mittelwerte der durchschnittlichen Vesikeloberfläche, des durchschnittlichen Vesikelvolumens und des Verhältnisses von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen von unstimulierten Wildtyp-JG-Zellen und JG-Zellen einer Ren-1d-Cre/Cre Maus. (WT unstimuliert: n=2; Andere: n=1). Tendenziell weisen die Vesikel der Ren-1d-Cre/Cre-Zelle ein deutlich verringertes durchschnittliches Vesikelvolumen auf. Dementsprechend ist auch das Verhältnis von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen verringert. Die durchschnittliche Vesikeloberfläche der Ren-1d-Cre/Cre-Zelle verändert sich im Vergleich zur WT-Zelle kaum.

( $5,21 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$ ). Es ist eine deutliche Verkleinerung des Verhältnisses von Gesamtvesikelvolumen zu Zytosolvolumen der Ren-1d Knockout Zelle (7 %) verglichen mit der Wildtyp-Zelle erkennbar. Da bei einer Messung der Reninsekretionsrate weder unter basalen Bedingungen, noch mit den bekannten Stimulationsparametern eine enzymatische Reninaktivität gemessen werden konnte, wurde auf eine 3-dimensionale Rekonstruktion einer stimulierten Ren-1d-Cre/Cre-JG-Zelle verzichtet.



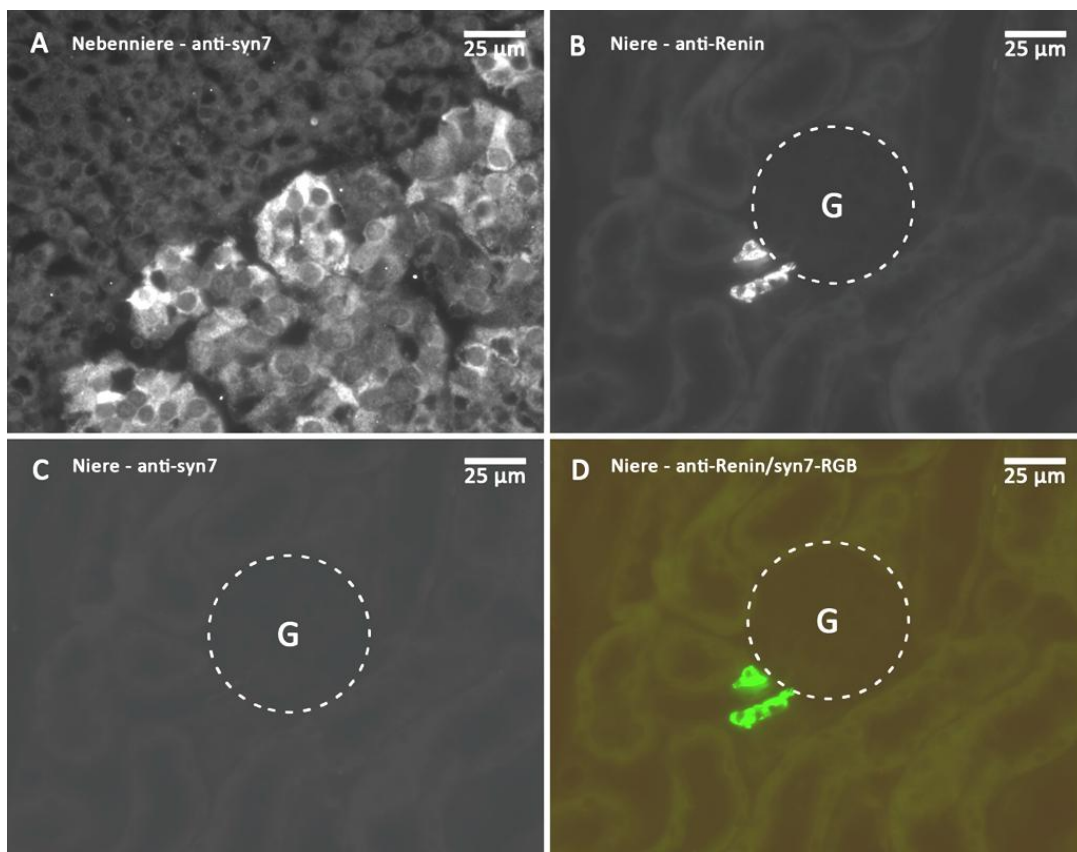
#### 4.4. Immunhistochemische Untersuchung von JG-Zellen

Sowohl der klassische Exozytoseprozess als auch die intrazelluläre Vesikelfusion erfordern spezifische Fusionsproteine. Nachdem über das Vorhandensein dieser SNARE-, Sec/Munc- und Rab-Proteine in reninbildenden Zellen nichts bekannt ist, wurde das Expressionsmuster einiger dieser Proteine mittels histologischer Immunfluoreszenzdoppelfärbungen in JG-Zellen untersucht, wobei als Vergleich klassische und atypische endo- und exokrine Zellen herangezogen wurden. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 38 beispielhaft dargestellt. Calnexin, ein Protein welches ausschließlich in der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) vorkommt, dient hier als ER-Marker und Positivbeispiel. Calnexin wurde immunhistochemisch unter anderem in histologischen, 5 µm dicken Paraffinschnitten des Pankreas (Abb. 38A) nachgewiesen. Eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung der reninproduzierenden JG-Zellen mit anti-Renin-IgG (Abb. 38B) und anti-Calnexin-IgG



**Abb. 34: Immunhistochemische Färbungen an histologischen Paraffinschnitten (5 µm) bei 400-facher Vergrößerung**  
**A:** Immunhistochemische Färbung gegen Calnexin (cal) im Pankreas. **B, C, D:** Immunfluoreszenzdoppelfärbung von JG-Zellen gegen Renin (B) und Calnexin (C). Die Immunreaktionen von Renin (grün) und Calnexin (rot) überlagern sich in den JG-Zellen und erzeugen somit eine gelbe Färbung (D).

(Abb. 38C) an Dünnschnitten der Niere liefert den Nachweis von Calnexin in JG-Zellen. Diese wird durch eine Kofärbung (Immunreaktion gegen Renin = Grün, Immunreaktion gegen Calnexin = Rot), in der sich Renin- und Calnexin-Signale in den JG-Zellen überlagern (gelbe Färbung) bestätigt (Abb. 38D). Ein Negativbeispiel stellt hingegen die Immunfluoreszenzfärbung von Synaptotagmin 7 dar. Synaptotagmin 7 wurde immunhistochemisch unter anderem in Paraffinschnitten der Nebenniere nachgewiesen (Abb. 39A). Eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung der JG-Zellen mit anti-Renin-IgG (Abb.



**Abb. 35: Immunhistochemische Färbungen an histologischen Paraffinschnitten (5 µm) bei 400-facher Vergrößerung**

**A:** Immunhistochemische Färbung gegen Synaptotagmin 7 (syn 7) in der Nebenniere. **B, C, D:** Immunfluoreszenzdoppelfärbung von JG-Zellen gegen Renin (B) und Synaptotagmin 7 (C). Es erfolgt keine Immunreaktion gegen Synaptotagmin 7 in JG- Zellen, somit ist nur die Immunfluoreszenzfärbung gegen Renin (Grün) sichtbar (D).

39B) und anti-Synaptotagmin 7-IgG (Abb. 39C) zeigt keine Immunreaktion gegen Synaptotagmin 7 in JG-Zellen. Dies wird durch eine Kofärbung (Immunreaktion gegen Renin = Grün, Immunreaktion gegen Synaptotagmin 7 = Rot) bestätigt (Abb. 39D). Nach diesem Schema wurden JG-Zellen auf das Vorhandensein von einigen SNARE-, Sec/Munc- und Rab-Proteinen analysiert. Jedoch konnten bisher immunhistochemisch keine der von uns untersuchten Proteine in diesen Zellen nachgewiesen werden (Tab. 1). Folgende Tabelle zeigt die bisher untersuchten Proteine.

	Pankreas	Schilddrüse	Nebenschilddrüse	Nebenniere	Niere	JG-Zelle
Vamp2/ Synaptobrevin	++	+	+	+	-	-
Vamp3/ Cellubrevin	++	+	-	-	-	-
Vamp5	+	-	+	-	-	-
Vamp7	+	+	+	+	-	-
Vamp8/ Endobrevin	++	-	+	-	++	-
Synaptotagmin 1	++	-	-	++	-	-
Synaptotagmin 7	+	-	-	++	-	-
Synaptotagmin 5/9	+	-	+	+	-	-
Munc18	-	-	+	-	++	-
Rab3B	++	-	-	-	-	-
Rab27A	+	+	+	+	-	-
SNAP25	++	-	-	-	-	-
SNAP23	+	-	+	-	-	-
LAMP1	-	+	+	-	+	-
Syntaxin 2	-	-	+	-	-	-
Syntaxin 4	+	-	+	+	-	-
CADPS 2	+	+	+	-	-	-
Complexin 1/2	+	-	+	+	-	-

**Tab. 1: Immunhistochemische Färbungen**

Keine der von uns untersuchten SNAREs und SNARE-assoziierten Proteine konnten immunhistochemisch in JG-Zellen nachgewiesen werden (+ = Färbung, ++ = starke Färbung, - = keine Färbung).

## 5. Diskussion

## 5.1. Die Morphologie von Reninspeichervesikeln in JG-Zellen des Wildtyps

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System mit der Aspartylprotease Renin als Schlüsselenzym spielt eine herausragende Rolle bei der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts. Obwohl die bereits durchgeführten Untersuchungen zum Regulationsmechanismus der Reninsynthese und -sekretion aus den juxtaglomerulären Epitheloidzellen der Niere sehr umfangreich sind, ist bisher noch relativ wenig über die Art der Speicherung von Renin und über den genauen Mechanismus der Reninsekretion bekannt. Mehrere Studien belegen, dass Renin in den JG-Zellen der Niere als Prorenin synthetisiert, im Golgi-Apparat glykolysiert und dann in elektronendichten Dense-Core-Vesikeln gespeichert wird, wo es durch proteolytische Spaltung in seine aktive Form überführt wird (Hackenthal et al., 1990; Morris, 1992; Taugner et al., 1987). Jedoch gibt es in der Literatur speziell zur Morphologie dieser Dense-Core-Vesikel unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Angaben. Während die Reninspeichervesikel in transmissionselektronischen (TEM) Aufnahmen einiger Arbeiten eine runde, regelmäßige Form aufweisen (Lacasse et al., 1985; Taugner et al., 1984b), erscheinen diese Vesikel in andern Arbeiten als unregelmäßig geformt und polymorph (Barajas, 1979; Rasch et al., 1998). Desweiteren gibt es Beobachtungen von anscheinend miteinander fusionierten Speichervesikeln (Skott und Taugner, 1987; Taugner und Metz, 1986) oder sich aufteilenden Vesikeln, die untereinander noch mit Membranbrücken verbunden sind (Rasch et al., 1998). Aus diesem Grund war es naheliegend, die Morphologie und Struktur der Reninspeichervesikel nicht nur anhand von 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen, sondern auch anhand von selbst erstellten 3-dimensionalen Teilausschnitten von JG-Zellen und den darin enthaltenen Strukturen zu untersuchen. 3-dimensionale Modelle wurden von unstimulierten Zellen, und von Zellen, deren Reninsekretionsrate pharmakologisch stimuliert wurde, erstellt. Pro Stimulationsstufe wurden mehrere Zellen anhand von TEM-Aufnahmen analysiert und maximal zwei repräsentative Zellen 3-dimensional rekonstruiert.

Im Zuge dieser Arbeit konnten in 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen von unstimulierten JG-Zellen sowohl runde Speichervesikel mit kreisförmigem Umfang, als auch

unregelmäßig geformte Vesikel beobachtet werden. Es existierten einige größere vesikuläre Strukturen, die anscheinend aus der Fusion von mehreren kleinen Speichervesikeln entstanden sind, sowie große, gänzlich unregelmäßig geformte Vesikel (vgl. Abb. 7). Dies bestätigt die bereits gemachten Beobachtungen von unregelmäßig geformten, polymorphen Reninspeichervesikeln (Rasch et al., 1998; Taugner und Metz, 1986). In den meisten Fällen erschien der Vesikelinhalt homogen und elektronendicht, in sehr seltenen Fällen waren kleine, vesikuläre Einschlüsse innerhalb der Speichervesikel zu erkennen, welche bereits in früheren Arbeiten entdeckt wurden (Taugner und Metz, 1986; Taugner et al., 1985). 3-dimensionale Rekonstruktionen von unstimulierten JG-Zellen zeigten, dass unregelmäßig geformte Vesikel 2-dimensionale Ausschnitte von verschiedenen Zwischenstadien der Reninspeicherstrukturen darstellen. Diese Zwischenstadien reichen von vereinzelt runden Vesikeln bis zu großen, miteinander verbundenen kavernenartigen Speicherstrukturen und Speichernetzwerken (vgl. Abb. 8). Viele, auf 2-dimensionalen Schnitten als vereinzelt erscheinende, runde Vesikel sind 3-dimensional mit diesen großen Speicherstrukturen vernetzt, d.h. mit Membranbrücken verbunden, was ansatzweise schon von Rasch et al. beobachtet wurde (Rasch et al., 1998). Da das relative Verhältnis zwischen vereinzelt auftretenden und großen, kavernenartigen Speicherstrukturen eine große Variabilität zwischen JG-Zellen von ansonsten unstimulierten Nieren aufweist, ist es wahrscheinlich, dass die Entwicklung von kleinen Vesikeln und großen Kavernen ein dynamischer, teilweise reversibler Prozess ist. Dieser Prozess beinhaltet sowohl die Fusion von mehreren kleinen Vesikeln zu Kavernen, als auch umgekehrt die Fragmentierung von kavernenartigen Speichernetzwerken in kleinere Vesikel.

## **5.2. Der Exozytosemechanismus in JG-Zellen**

Exozytoseereignisse in JG-Zellen, wie beispielsweise Omega-Strukturen oder Kontakte von Vesikel- und Zellmembran, konnten in 3-dimensionalen Rekonstruktionen von unstimulierten Zellen, und Zellen, deren Reninsekretionsrate moderat stimuliert wurde (3 min 10 nM Isoproterenol), nicht beobachtet werden. Zwar steigt die Reninsekretionsrate in diesen Zellen an, jedoch führt eine Stimulation durch Erhöhung der

intrazellulären cAMP-Konzentration mit Isoproterenol allein weder zu einer Veränderung der durchschnittlichen Vesikelgröße und des durchschnittlichen Vesikelvolumens, noch zu einer Veränderung des Verhältnisses von Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen (vgl. Abb. 9). Diese Ergebnisse bestätigen Versuche von Ogawa et al. an Nierenschnitten, die zeigten, dass eine Behandlung mit Isoproterenol allein nicht zu einer ultrastrukturellen Veränderung von JG-Zellen führt (Ogawa et al., 1995). Andererseits ist es nicht auszuschließen, dass im Zuge dieser Arbeit die bei dieser niedrigen Stimulationsstufe auftretenden Exozytoseereignisse übersehen wurden, da nach Berechnungen von Taugner et al. bei Mäusen im gesamten Organismus nur ca. 20-500 Exozytosen von Reninspeichervesikeln pro Minute notwendig sind, um einen konstanten Plasmareninspiegel aufrecht zu erhalten (Taugner et al., 1984b). Die Chance ein Exozytoseereignis in unstimulierten oder moderat stimulierten JG-Zellen festzuhalten ist demnach, obwohl sie größer ist als bei 2-dimensionalen Ultradünnschnitten, auch in 3-dimensionalen Teilausschnitten dieser Zellen relativ gering.

Eine sechsminütige Stimulation der Reninsekretionsrate durch Erniedrigung der extrazellulären Calcium-Konzentration mit EGTA führte auf den ersten Blick nicht zu morphologischen Veränderungen der Vesikelstruktur. Betrachtete man zusätzlich zu den TEM-Aufnahmen das 3-dimensionale Modell, offenbarte sich ein deutlich höherer Vernetzungsgrad der Vesikel (vgl. Abb. 10 A, B). Es sind verhältnismäßig wenig kleine, abgeschlossene Vesikel zu erkennen. Desweiteren konnten im rekonstruierten Teilausschnitt der repräsentativen Zelle fünf Kontakte von Vesikelmembran und Zellmembran beobachtet werden (vgl. Abb. 11). Dieser Membrankontakt ist in juxtaglomerulären Zellen ein klares Anzeichen für einen Exozytosevorgang, da in diesen Zellen sonstige, normalerweise in vielen endo- und exokrinen Zellen zu beobachtende Anzeichen für Exozytose, wie zum Beispiel klare Omega-förmige Hohlräume mit darin enthaltenem Vesikelinhalt, nur in Ausnahmefällen beobachtet werden konnten. Dies wurde in zahlreichen Arbeiten bestätigt, in denen die Morphologie der Reninspeichervesikel unter Stimulation der Reninsekretionsrate untersucht wurde, sei es durch Entfernung der Nebenniere (Peter, 1976; Taugner et al., 1984b), durch Verabreichung von Furosemid (Taugner et al., 1984b) oder durch

Superfusion mit hyperosmolaren Lösungen (Skott und Taugner, 1987). Der höhere Vernetzungsgrad der Reninspeicherstrukturen der für sechs Minuten mit EGTA stimulierten JG-Zelle wurde durch eine tendenzielle Erhöhung des durchschnittlichen Vesikelvolumens und der durchschnittlichen Vesikeloberfläche bestätigt (vgl. Abb. 12). Im Allgemeinen führte eine alleinige Stimulation mit EGTA zu einer deutlicheren morphologischen Veränderung der Speichervesikel als eine alleinige Stimulation mit Isoproterenol. Anscheinend führt eine Erniedrigung der intrazellulären Calcium-Konzentration auf bisher unbekannte Weise zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Fusion von Vesikel- und Zellmembran.

Eine zehnminütige Stimulation der Reninsekretionsrate durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit Isoproterenol und zusätzlich durch Erniedrigung der extrazellulären Calcium-Konzentration mit EGTA führte, wie schon von Ogawa et al. beobachtet, zu einem sehr starken Anstieg der Reninsekretionsrate (Ogawa et al., 1995). Morphologische Veränderungen der Reninspeichervesikel wurden sowohl in 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen als auch den 3-dimensionalen Modellen der repräsentativen Zellen deutlich. Auf Ultradünnschnitten waren, zusätzlich zu runden und unregelmäßig geformten Speicherstrukturen, Vesikel zu erkennen, die eine niedrigere Elektronendichte als normale Reninspeichervesikel aufwiesen (vgl. Abb. 16). Betrachtete man das 3-dimensionale Modell so wurde ein hoher Vernetzungsgrad der vesikulären Speicherstrukturen deutlich, was durch einen weiteren Anstieg der durchschnittlichen Vesikeloberfläche und des durchschnittlichen Vesikelvolumens im Vergleich zur unstimulierten Zelle bestätigt wurde (vgl. Abb. 17). Desweiteren konnten auch bei dieser Stimulationsstufe in den rekonstruierten Teilausschnitten der Zellen durchschnittlich fünf Kontakte von Vesikelmembran und Zellmembran beobachtet werden (vgl. Abb. 15 B).

Eine Steigerung des Vernetzungsgrades der Reninspeichervesikel bei Erhöhung der Intensität der Stimulation und einer damit einhergehenden Steigerung der Reninsekretionsrate wurden durch weitere Versuche an JG-Zellen mit höheren Stimulationsstufen bestätigt. Eine zwölfminütige Stimulation (6min Isoproterenol, dann 6min Isoproterenol + EGTA) führte zu einem, sowohl an TEM-Aufnahmen und im 3-dimensionalen Modell der repräsentativen JG-Zelle zu beobachtenden, noch



höheren Vernetzungsgrad der Reninspeichervesikel. Ein Großteil des Zellvolumens wurde im rekonstruierten Teilausschnitt von nur vier Speichernetzwerken ausgefüllt, welche teilweise mit der Zellmembran in Kontakt standen (vgl. Abb. 19). Dieser beobachtete höhere Vernetzungsgrad wurde durch ein im Vergleich zur unstimulierten und zehn Minuten stimulierten Zelle noch höheres durchschnittliches Vesikelvolumen und eine erhöhte durchschnittliche Vesikeloberfläche bestätigt (vgl. Abb. 22). Auffällig war jedoch, dass trotz Steigerung des Vernetzungsgrades der Vesikel und der Reninsekretionsrate die Anzahl der Exozytoseereignisse nicht in gleichem Maße zunahm, sondern relativ konstant blieb (vgl. Abb. 20).

Eine sehr starke Stimulation der Reninsekretionsrate mit Isoproterenol und EGTA über einen längeren Zeitraum hinweg (15min) führte zu einer deutlichen Veränderung der Vesikelmorphologie, die bereits in 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen sichtbar wurde (vgl. Abb. 24). Zusätzlich zu elektronendichten Vesikeln, und den bereits beschriebenen Vesikeln mit geringerer Elektronendichte, existierte eine Vielzahl von klaren, elektronendurchlässigen vesikulären Strukturen mit unregelmäßig verteiltem Inhalt, die ebenfalls von Ogawa et al. beschrieben wurden (Ogawa et al., 1995). Die 3-dimensionale Analyse dieser Strukturen zeigte, dass diese fast vollständig miteinander vernetzt waren und zusammen einen großen kavernenartigen Hohlraum bildeten (vgl. Abb. 23 A,B). Dementsprechend erhöht waren die durchschnittliche Vesikeloberfläche und das durchschnittliche Vesikelvolumen in diesen Zellen (vgl. Abb. 25). Die Vermutung liegt nahe, dass diese Vesikel mit verminderter Elektronendichte sowie die klaren elektronendurchlässigen Vesikel, teilweise bzw. vollständig entleert waren.

Durch die Beobachtungen von Exozytosevorgängen bei JG-Zellen, deren Reninsekretionsrate entweder nur mit EGTA, oder mit einer Kombination von Isoproterenol und EGTA stimuliert wurde, werden die Ergebnisse einiger Arbeiten unterstützt, die die Exozytose von Speichervesikeln als relevanten Mechanismus für die Freisetzung von aktivem Renin postulieren (Friis et al., 1999; Friis et al., 2002; Peti-Peterdi et al., 2004; Rasch et al., 1998). Ein Transportmechanismus durch intrazelluläre Solubilisierung des Inhalts der Speichervesikel und darauffolgenden Transport durchs Zytoplasma, welcher von Rouiller und Orci 1971 entdeckt wurde und später in einigen Arbeiten als möglicher Mechanismus der Reninsekretion postuliert wurde (Fray, 1991;

King et al., 1993; Kon et al., 1992), konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Da in den im Zuge dieser Arbeit gemachten Versuchen eine große Erhöhung der Reninsekretionsrate nicht mit einer entsprechenden Erhöhung der Anzahl der Exozytoseereignisse einher ging, ist anzunehmen, dass eine intrazelluläre Verschmelzung von Vesikelmembranen, welche in reninproduzierenden Zellen bereits beobachtet wurde (Ogawa et al., 1995; Taugner und Metz, 1986), für einen erhöhten Ausstoß von aktivem Renin in den Intrazellulärraum verantwortlich ist. Ein derartiger Ausstoß von gespeichertem Material wird als Compound-Exozytose bezeichnet und wurde bereits in vielen Zellarten, wie beispielsweise in Azinus- oder Betazellen des Pankreas, in Mastzellen, in Eosinophilen und in Neutrophilen beschrieben (Bokvist et al., 2000; Hafez et al., 2003; Hartmann et al., 2003; Lollike et al., 2002; Scepek und Lindau, 1993). Man nimmt an, dass dieser Mechanismus in diesen Zellen dazu dient, den Ausstoß von sekretorischen Produkten in einem gewissen Zeitraum zu maximieren (Pickett und Edwardson, 2006). Dieser Mechanismus würde also eine praktikable Möglichkeit darstellen, bei einer gesteigerten Reninsekretionsrate, die sich bekanntermaßen bei entsprechender Stimulation schnell um den Faktor 30 erhöhen kann, große Mengen von gespeichertem Renin innerhalb eines kurzen Zeitraums freizusetzen. Der Compound-Mechanismus als möglicher Freisetzungsmechanismus von aktivem Renin in Kombination mit einigen wenigen Fusionsporen könnte ausserdem die tiefen "Plasmamembraneinstülpungen" erklären, die im Zuge dieser Arbeit zwar nicht beobachtet, aber bereits in vielen anderen Arbeiten beschrieben wurden, in denen Reninzellen elektronenmikroskopisch analysiert wurden (Peter, 1976; Rasch et al., 1998; Ryan et al., 1982). Diese Einstülpungen wurden bei starker Stimulation der Reninsekretion zunehmend markanter, und es erscheint denkbar, dass eine durch Fusion mehrerer Speichervesikel entstandene kavernenartige Struktur mit dazugehöriger Fusionspore als Plasmamembraneinstülpung interpretiert werden kann. Desweiteren würde eine intrazelluläre Fusion von Speichervesikeln die Tatsache erklären, dass wir während der Stimulation der Reninsekretion keinerlei Anzeichen für eine gerichtete Bewegung der Speichervesikel zur Zellmembran beobachten konnten, wie sie in anderen sekretorischen Zellen auftreten (Somers et al., 1979; Trifaro et al., 2008) und würde Beobachtungen von Peti-Peterdi et al. erklären, die bei real-time Untersuchungen der Reninfreisetzung in vivo, durch Labeling der Speichervesikel mit

acidotropen Fluorophoren wie Quinacrin, ebenfalls keinerlei gerichtete Vesikelbewegung entdecken konnten (Peti-Peterdi et al., 2004). Es konnte im Zuge dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, welche Unterart der Compound Exozytose vorliegt. Wie bereits erwähnt, verschmelzen bei der sequenziellen CE zuerst sogenannte Primärvesikel mit der Plasmamembran. Diese Primärvesikel stellen dann das Ziel einer Fusion mit tiefer im Zellinneren gelegenen Sekundärvesikeln dar (vgl. Abb. 5A/B) (Ichikawa, 1965; Nemoto et al., 2001). Im Gegensatz dazu verschmelzen bei der sogenannten multivesikulären CE die sekretorischen Vesikel zuerst homotypisch miteinander. Die entstehenden multivesikulären Körper fusionieren daraufhin mit der Zellmembran ( vgl. Abb. 5A) (Alvarez de Toledo und Fernandez, 1990). Da aber diese beiden Unterarten in vielen Zellen parallel auftreten, und da in den Im Zuge dieser Arbeit untersuchten 3-dimensionalen Teilausschnitten der JG-Zellen sowohl kleine kugelförmige Vesikel, als auch große netzwerkartige Kavernensysteme mit der Zellmembran fusionierten, ist diese Unterscheidung bei JG-Zellen bisher nicht möglich.

Der Vernetzungsgrad der Reninspeichervesikel in den untersuchten 3-dimensionalen Teilausschnitten erhöhte sich proportional zur Stimulation von Isoproterenol und EGTA. Es wäre möglich, dass eine Stimulation der Reninsekretion durch Isoproterenol und EGTA die "Fusogenität" der Vesikelmembranen, d.h. die Wahrscheinlichkeit der Membranverschmelzung der Vesikelmembranen untereinander erhöht, sobald diese durch zufällige stochastische Bewegungen miteinander in Kontakt treten. Dies wäre im Einklang mit früheren Ergebnissen von Kurtz und Schweda (Kurtz und Schweda, 2006), die die Auswirkung auf akute Änderungen der Osmolarität im Perfusat isolierter Nieren auf die Reninsekretion untersuchten. Es stellte sich bei diesen Versuchen heraus, dass eine Erhöhung der Osmolarität zu einem sofortigen Anstieg der Reninsekretion führte. Nimmt man an, dass eine akute Erhöhung der Osmolarität zu einer Zellschrumpfung führt, so würde man erwarten, dass diese Zellschrumpfung die Wahrscheinlichkeit der Kontakte sowohl zwischen Vesikeln untereinander, als auch zwischen Vesikel- und Zellmembran erhöhen würde. Desweiteren entdeckten Schweda et al. (Kurtz und Schweda, 2006), dass die absolute Höhe der Änderung der Reninsekretionsrate, welche durch die Osmolaritätsänderung induziert wurde, proportional zum Grad der Vorstimulation der Sekretion durch Isoproterenol oder EGTA anstieg. Dies würde

ebenfalls die in dieser Arbeit aufgestellte Theorie bestätigen, dass ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration oder eine Erniedrigung der extrazellulären Calcium-Konzentration primär die Fusogenität der Vesikelmembranen untereinander erhöht. Die Größe der Renin enthaltenden Kavernen würde dann zusammen mit der Osmolaritätsänderung die absolute Reninsekretionsrate beeinflussen.

### **5.3. Untersuchungen der Vesikelmorphologie in JG-Zellen der Beige-Maus**

Die sekretorischen Vesikel juxtaglomerulärer Epitheloidzellen besitzen bestimmte Eigenschaften, die in dieser speziellen Kombination nur in Lysosomen vereint sind. Man entdeckte schon vor einiger Zeit, dass die Reninspeichervesikel neben Renin weitere Enzyme enthalten, die charakteristisch für Lysosomen sind, wie z.B. saure Phosphatase (acP) (Fisher, 1966; Gomba und Soltesz, 1969; Lee et al., 1966),  $\beta$ -Glucuronidase (Gomba und Soltesz, 1969), und N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (Soltesz et al., 1979). Desweiteren wurde eine Relevanz des bereits erwähnten lysosomal-trafficking-Proteins für die korrekte Ausbildung von Reninspeichervesikeln entdeckt, ein Protein welches ansonsten nur an der Regulation der Lysosomengröße beteiligt ist (Jensen et al., 1997b). Diese Relevanz konnte in dieser Arbeit durch 3-dimensionale Rekonstruktion von JG-Zellen von Beige-Mäusen bestätigt werden, deren LYST- bzw. CHS1-Gen deletiert ist, und die demzufolge kein funktionelles LYST-Protein produzieren. Die Rekonstruktion erfolgte bei jeweils einer repräsentativen Zelle mit und ohne Stimulation der Reninsekretionsrate. Wie schon von Jensen et al. beobachtet, führt ein funktioneller Knockout des LYST-Gens zu sehr großen Reninspeichervesikeln. Die Vesikel der JG-Zelle der unstimulierten LYST Knockout Maus waren teilweise fladenartig geformt, teilweise besaßen sie eine sehr unregelmäßige Oberfläche (vgl. Abb. 27). Es existierten nur wenige, massiv vergrößerte Vesikel, was auch bei Berechnung der durchschnittlichen Vesikeloberfläche und der durchschnittlichen Vesikelgröße offenbar wurde (vgl. Abb. 29). Myelinartige bzw. bläschenartige Einschlüsse in den Reninspeichervesikeln, wie von Taugner et al. beschrieben (Taugner und Metz, 1986; Taugner et al., 1985), welche im Zuge dieser

Arbeit in Wildtyp-JG-Zellen nur sehr selten beobachtet wurden, traten in JG-Zellen der Beige-Mäuse mit großer Häufigkeit auf (vgl. Abb. 28). Es ist anzunehmen, dass das LYST-Protein auch in den Reninzellen verantwortlich für die Ausbildung kleinerer Reninspeichervesikel, vermutlich durch Abschnürung von größeren Kavernen, ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Theorie einiger Arbeitsgruppen, die postulieren, dass die sekretorischen Vesikel der JG-Zellen modifizierte sekretorische Lysosomen sind (Gomba und Soltesz, 1969; Taugner et al., 1985). Unter Stimulation der Reninsekretionsrate der Beige-JG-Zellen konnten wir keine Veränderung der Vesikelmorphologie feststellen, jedoch einige Kontakte von Vesikel- und Zellmembran beobachten. Auch eine Messung der Reninsekretionsrate von Wildtyp- und Beige-Zellen unter gleichen Stimulationsbedingungen lieferte keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 32), was wiederum die Ergebnisse von Jensen et al. (Jensen et al., 1997b) bestätigt. Diese fanden heraus, dass sowohl die Plasmareninkonzentration als auch die Zahl der Reninzellen in Beige-Mäusen proportional verringert waren, und folglich die Reninsekretionsrate pro Zelle keine signifikanten Unterschiede aufwies. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine Fusion von Vesikel- und Zellmembran bei JG-Zellen im Allgemeinen nicht auf kleine Reninspeichervesikel beschränkt ist, sondern auch bei sehr großen kavernenartigen Vesikeln, wie sie in der Beige-Zelle auftraten, stattfindet. Bei Berechnung der durchschnittlichen Vesikeloberfläche und des durchschnittlichen Vesikelvolumens der stimulierten Beige-JG-Zelle fiel auf, dass diese Werte vergleichbar mit denen der unstimulierten Zelle waren. (vgl. Abb. 31). Da für die unstimulierte und stimulierte Beige-Zelle nur jeweils eine 3-dimensionale Rekonstruktion zur Verfügung stand, kann dem nur wenig Aussagekraft beigemessen werden. Wichtig ist, dass sowohl unstimulierte als auch stimulierte Beige-JG-Zelle tendenziell eine höhere durchschnittliche Vesikeloberfläche als auch ein höheres durchschnittliches Vesikelvolumen aufwiesen, was die Beobachtungen an 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen und am 3-dimensionalen Modell, sowie die Befunde mehrerer Arbeitsgruppen (Jensen et al., 1997b; Ozaki et al., 1994), bestätigt.

## 5.4. Untersuchungen der Vesikelmorphologie in JG-Zellen der Ren-1d-Cre/Cre-Maus

In einigen Mausstämmen existiert neben dem Renin-Gen Ren-1d das Gen Ren-2, welches vermutlich durch Genduplikation entstanden ist (Abel und Gross, 1990; Dickinson et al., 1984). Während das Ren-1-Protein glykosyliert wird, ist dies beim Ren-2-Protein nicht der Fall (Sigmund und Gross, 1991). Es wurde schon vor längerer Zeit postuliert, dass die Entwicklung von elektronendichten Speichervesikeln in JG-Zellen von der Synthese von glykosyliertem Prorenin abhängt (Morris, 1992; Mullins et al., 2000), und dass das nicht glykosylierte Ren-2-Protein konstitutiv freigesetzt wird (Clark et al., 1997; Sharp et al., 1996). Unsere Untersuchungen an Ren-1d-Cre/Cre-Mäusen, die kein funktionelles Ren-1d-Protein, sondern ausschließlich Ren-2-Protein exprimieren, bestätigen diese Theorie. Sowohl auf 2-dimensionalen TEM-Aufnahmen als auch in der 3-dimensionalen Rekonstruktion einer repräsentativen JG-Zelle dieses Genotyps konnten anstatt zahlreicher elektronendichter Speichervesikel nur sehr kleine rudimentär vorhandene Strukturen beobachtet werden, die zudem weniger elektronendicht waren als die üblichen Renin enthaltenden Vesikel (vgl. Abb. 33, 34). Dies wurde durch Berechnung des Verhältnisses von durchschnittlichem Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen bestätigt. Der Anteil des Vesikelvolumens am Zytosolvolumen der Zelle ist bei diesem Genotyp stark verringert, da aber für die Berechnung wie bei der Beige-JG-Zelle nur eine 3-dimensionale Rekonstruktion zur Verfügung stand, kann dem nur wenig Aussagekraft beigemessen werden. Zudem konnte bei einer Messung der Reninsekretionsrate bei Ren-1d-Cre/Cre-Mäusen weder unter basalen Bedingungen, noch mit den bekannten Stimulationsparametern eine enzymatische Reninaktivität gemessen werden. Einiges spricht demnach dafür, dass die in den Ren-1d-Cre/Cre-Zellen gefundenen Strukturen eher die prinzipielle Fähigkeit der Reninzellen widerspiegeln, Speichervesikel zu bilden, und dass in ihnen kein funktionelles Renin-Protein gespeichert wird.

## 5.5. Histologischer Nachweis von SNARE-Proteinen in JG-Zellen

Bisher wurden noch keine Proteine identifiziert, die direkt an der Fusion der Reninspeichervesikel mit der Zellmembran beteiligt sind. Die wahrscheinlichsten Kandidaten für diese Rolle stammen aus der Familie der SNARE-Proteine (Jahn und Scheller, 2006; Risselada und Grubmüller, 2012). Es war demzufolge ein Ziel dieser Arbeit, SNARE-Proteine auf immunhistochemischem Weg in JG-Zellen nachzuweisen. Als Positivkontrollen wurden klassisches endo- und exokrines Gewebe wie z.B. Pankreas, Nebenniere, Schilddrüse und Nebenschilddrüse herangezogen. Um die Vermutung, dass Reninspeichervesikel lysosomalen Ursprungs sind zu bestätigen, wurden unter anderem SNAREs untersucht, die nachweislich an sekretorischen Lysosomen in anderen Zellen assoziiert sind, wie z.B. SNAP-23, Syntaxin 3, Syntaxin 4, VAMP 2 und VAMP 7 (Brumell et al., 1995; Guo et al., 1998; Hibi et al., 2000; Paumet et al., 2000). Der Nachweis von SNAREs in JG-Zellen auf immunhistochemischem Wege erwies sich als unerwartet schwierig. In dieser Arbeit konnten keine SNAREs oder SNARE-assoziierte Proteine in JG-Zellen nachgewiesen werden (vgl. Tab. 1). Dennoch gibt es mehrere Befunde, die für eine Rolle von SNARE-Proteinen bei der Reninsekretion sprechen. Erst kürzlich fanden Mendez et al. durch Immunfluoreszenzlabeling von JG-Zellen und die anschließende Untersuchung mit Hilfe eines konfokalen Laser-scanning-Mikroskops heraus, dass das vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP 2) mit Reninspeichervesikeln kolokalisiert (Mendez et al., 2011). Weitere Versuche dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Spaltung von VAMP 2 mit Hilfe von Tetanus-Toxin sowohl die cAMP-vermittelte Reninfreisetzung in JG-Zellen, als auch die cAMP-vermittelte Exozytoserate dieser Zellen um ca. 50% reduzierte (Mendez et al., 2011). Geht man von der Compound-Exozytose als Freisetzungsmechanismus in JG-Zellen aus, dann könnte auch VAMP 8 in diesen Zellen eine wichtige Rolle spielen. Jüngsten Untersuchungen zufolge ist Endobrevin (VAMP 8) maßgeblich an der Sekundärfusion, also der Fusion von Vesikeln untereinander, jedoch nicht bei der Primärfusion beteiligt (Behrendorff et al., 2011). Diese Befunde konnten durch die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbemethoden an Gewebedünnschnitten unter Verwendung eines inversen Fluoreszenzmikroskops nicht bestätigt werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass SNARE-Proteine in JG-

Zellen anscheinend nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind, so dass sie mit den von uns verwendeten Methoden nicht nachweisbar waren. Den immunhistochemische Nachweis von SNAREs und SNARE-assoziierten Proteinen in JG-Zellen gilt es demzufolge in der Zukunft noch zu erbringen.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abel KJ, Gross KW (1990): Physical characterization of genetic rearrangements at the mouse renin loci. *Genetics* 124(4): 937-47.
- Alvarez de Toledo G, Fernandez JM (1990): Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J Gen Physiol* 95(3): 397-409.
- Archer DA, Graham ME, Burgoyne RD (2002): Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 277(21): 18249-52.
- Ardailou R (1999): Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S30-9.
- Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA, Palfrey HC (1995): Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves  $\text{Ca}^{2+}$ , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(18): 8328-32.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D (2001): Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl)* 79(2-3): 76-102.
- Barajas L (1979): Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 237(5): F333-43.
- Baram D, Adachi R, Medalia O, Tuvim M, Dickey BF, Mekori YA, Sagi-Eisenberg R (1999): Synaptotagmin II negatively regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered exocytosis of lysosomes in mast cells. *J Exp Med* 189(10): 1649-58.
- Baram D, Linial M, Mekori YA, Sagi-Eisenberg R (1998):  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, synaptotagmin I. *J Immunol* 161(10): 5120-3.
- Baumbach L, Leyssac PP, Skinner SL (1976): Studies on renin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, urea, ouabain and ethacrynic acid. *J Physiol* 258(1): 243-56.
- Bean AJ, Zhang X, Hokfelt T (1994): Peptide secretion: what do we know? *FASEB J* 8(9): 630-8.
- Behrendorff N, Dolai S, Hong W, Gaisano HY, Thorn P (2011): Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) selectively required for sequential granule-to-granule fusion. *J Biol Chem* 286(34): 29627-34.

- Beierwaltes WH (2006): cGMP stimulates renin secretion in vivo by inhibiting phosphodiesterase-3. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(6): F1376-81.
- Bell PD, Lapointe JY (1997): Characteristics of membrane transport processes of macula densa cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24(7): 541-7.
- Bell PD, Lapointe JY, Sabirov R, Hayashi S, Peti-Peterdi J, Manabe K, Kovacs G, Okada Y (2003): Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4322-7.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH (2001): A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409(6822): 839-41.
- Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, Lohse MJ (2001): Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 59(2): 515-31.
- Bokvist K, Holmqvist M, Gromada J, Rorsman P (2000): Compound exocytosis in voltage-clamped mouse pancreatic beta-cells revealed by carbon fibre amperometry. *Pflugers Arch* 439(5): 634-45.
- Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Takamori S, Matti U, Rettig J, Sudhof T, Bruns D (2005): v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J* 24(12): 2114-26.
- Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S (1995): Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol* 269(6 Pt 2): F793-805.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R (1992): Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256(5059): 1021-5.
- Brown RD, Thoren P, Steege A, Mrowka R, Sallstrom J, Skott O, Fredholm BB, Persson AE (2006): Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure regulation and renin release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5): R1324-9.
- Brumell JH, Volchuk A, Sengelov H, Borregaard N, Cieutat AM, Bainton DF, Grinstein S, Klip A (1995): Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments. *J Immunol* 155(12): 5750-9.
- Burgess TL, Kelly RB (1987): Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3: 243-93.

- Burgoyne RD, Morgan A (1998a): Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays* 20(4): 328-35.
- Burgoyne RD, Morgan A (1998b): Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 24(5-6): 367-76.
- Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ (1997): Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100(6): 1566-74.
- Castrop H (2007): Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 189(1): 3-14.
- Castrop H, Klar J, Wagner C, Hoehnerl K, Kurtz A (2003): General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3): F518-24.
- Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, Schnermann J (2004): Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(5): F848-57.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973): Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57(2): 499-524.
- Chapman ER (2002): Synaptotagmin: a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7): 498-508.
- Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R (1995): Ca<sup>2+</sup> regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 270(40): 23667-71.
- Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Arac D, Machius M, Sudhof TC, Rizo J (2002): Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 33(3): 397-409.
- Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung YC, Scheller RH (1999): SNARE complex formation is triggered by Ca<sup>2+</sup> and drives membrane fusion. *Cell* 97(2): 165-74.
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2003): Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 72: 175-207.

- Chiu N, Park I, Reid IA (1996): Stimulation of renin secretion by the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram. *J Pharmacol Exp Ther* 276(3): 1073-7.
- Chiu T, Reid IA (1996): Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 278(2): 793-9.
- Chiu YJ, Hu SH, Reid IA (1999): Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 290(1): 16-9.
- Churchill PC, Churchill MC (1985): A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 232(3): 589-94.
- Clark AF, Sharp MG, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ (1997): Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 272(29): 18185-90.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE (1990): SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61(4): 709-21.
- Cohen Y, Rahamimov R, Naveh-Many T, Silver J, Rahamimoff R (1997): Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells? *Am J Physiol* 273(3 Pt 1): E631-7.
- Coppola T, Frantz C, Perret-Menoud V, Gattesco S, Hirling H, Regazzi R (2002): Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. *Mol Biol Cell* 13(6): 1906-15.
- Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, Spurney RF, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM (2005): Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 115(4): 1092-9.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52(3): 415-72.
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS (2000): Lysosome-related organelles. *FASEB J* 14(10): 1265-78.

- Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF (1986): Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(19): 7552-6.
- DiBona GF, Kopp UC (1997): Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77(1): 75-197.
- Dickinson DP, Gross KW, Piccini N, Wilson CM (1984): Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics* 108(3): 651-67.
- Dietrich LE, Boeddinghaus C, LaGrassa TJ, Ungermann C (2003): Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta* 1641(2-3): 111-9.
- Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J (2007): Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8): 2697-702.
- Easom RA (2000): Beta-granule transport and exocytosis. *Semin Cell Dev Biol* 11(4): 253-66.
- Ehmke H, Persson P, Fischer S, Hackenthal E, Kirchheim H (1989): Resetting of pressure-dependent renin release by intrarenal alpha 1-adrenoceptors in conscious dogs. *Pflugers Arch* 413(3): 261-6.
- Elhamdani A, Azizi F, Artalejo CR (2006): Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *J Neurosci* 26(11): 3030-6.
- Fasshauer D (2003): Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1641(2-3): 87-97.
- Fasshauer D, Eliason WK, Brunger AT, Jahn R (1998a): Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37(29): 10354-62.
- Fasshauer D, Margittai M (2004): A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem* 279(9): 7613-21.
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998b): Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15781-6.

- Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J (1994): Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol* 4(1): 1-4.
- Fiebig KM, Rice LM, Pollock E, Brunger AT (1999): Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol* 6(2): 117-23.
- Fisher ER (1966): Lysosomal nature of juxtaglomerular granules. *Science* 152(3730): 1752-3.
- Fray JC (1991): Regulation of renin secretion by calcium and chemiosmotic forces: (patho) physiological considerations. *Biochim Biophys Acta* 1097(4): 243-62.
- Friis UG, Jensen BL, Aas JK, Skott O (1999): Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res* 84(8): 929-36.
- Friis UG, Jensen BL, Hansen PB, Andreassen D, Skott O (2000): Exocytosis and endocytosis in juxtaglomerular cells. *Acta Physiol Scand* 168(1): 95-9.
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreassen D, Hansen PB, Skott O (2002): Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res* 90(9): 996-1003.
- Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nusing RM, Skott O, Jensen BL (2005): Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(5): F989-97.
- Fukuda M (2003): Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *J Biol Chem* 278(17): 15373-80.
- Fukuda M (2005): Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J Biochem* 137(1): 9-16.
- Fukuda M, Kanno E, Yamamoto A (2004): Rabphilin and Noc2 are recruited to dense-core vesicles through specific interaction with Rab27A in PC12 cells. *J Biol Chem* 279(13): 13065-75.
- Gaisano HY, Ghai M, Malkus PN, Sheu L, Bouquillon A, Bennett MK, Trimble WS (1996): Distinct cellular locations of the syntaxin family of proteins in rat pancreatic acinar cells. *Mol Biol Cell* 7(12): 2019-27.

- Galas MC, Chasserot-Golaz S, Dirrig-Grosch S, Bader MF (2000): Presence of dynamin--syntaxin complexes associated with secretory granules in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 75(4): 1511-9.
- Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A, Walter U, Poller W, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM (1998): Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 9003-8.
- Ganten D, Hutchinson JS, Schelling P, Ganten U, Fischer H (1976): The iso-renin angiotensin systems in extrarenal tissue. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3(2): 103-26.
- Geppert M, Sudhof TC (1998): RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci* 21: 75-95.
- Gnaedinger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Sha SG, Muff R, Born W, Rascher W, Fischer JA (1989): Distinct hemodynamic and renal effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin in men. *Am J Physiol* 257(6 Pt 1): E848-54.
- Golin R, Pieruzzi F, Munforti C, Busca G, Di Blasio A, Zanchetti A (2001): Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat. *J Hypertens* 19(7): 1271-7.
- Gomba S, Soltesz BM (1969): Histochemistry of lysosomal enzymes in juxtaglomerular cells. *Experientia* 25(5): 513.
- Gomi H, Mori K, Itohara S, Izumi T (2007): Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 18(11): 4377-86.
- Griffiths GM (1996): Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. *Trends Cell Biol* 6(9): 329-32.
- Grote E, Hao JC, Bennett MK, Kelly RB (1995): A targeting signal in VAMP regulating transport to synaptic vesicles. *Cell* 81(4): 581-9.
- Grunberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F (2006): The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99(11): 1197-206.



- Guo Z, Turner C, Castle D (1998): Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell* 94(4): 537-48.
- Gut A, Kiraly CE, Fukuda M, Mikoshiba K, Wollheim CB, Lang J (2001): Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 114(Pt 9): 1709-16.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70(4): 1067-116.
- Hafez I, Stolpe A, Lindau M (2003): Compound exocytosis and cumulative fusion in eosinophils. *J Biol Chem* 278(45): 44921-8.
- Hall JE (1986): Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 250(6 Pt 2): R960-72.
- Hall JE (2003): Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* 24(1): 27-39.
- Hansen NJ, Antonin W, Edwardson JM (1999): Identification of SNAREs involved in regulated exocytosis in the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 274(32): 22871-6.
- Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, Huang PL, Fishman MC, Beierwaltes WH, Carretero OA (1997): Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension* 29(1 Pt 2): 297-302.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994): Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94(6): 2504-10.
- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS (1997): Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2): F170-7.
- Hartmann J, Scepek S, Hafez I, Lindau M (2003): Differential regulation of exocytotic fusion and granule-granule fusion in eosinophils by Ca<sup>2+</sup> and GTP analogs. *J Biol Chem* 278(45): 44929-34.
- Hauger-Kleve JH, De Vito E, Fasciolo JC (1977): The effect of thyroid hormone on renin production and release by rat kidney slices. *Acta Physiol Lat Am* 27(1): 37-41.

- Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schutz G, Schweda F (2007): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 18(4): 1150-6.
- Hibi T, Hirashima N, Nakanishi M (2000): Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 36-41.
- Hocherl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF, Kurtz A (2002): Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(2): F294-301.
- Hocherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A (2001): Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflugers Arch* 442(6): 821-7.
- Holmer S, Eckardt KU, LeHir M, Schricker K, Riegger G, Kurtz A (1993): Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Arch* 425(1-2): 62-7.
- Holmer S, Rinne B, Eckardt KU, Le Hir M, Schricker K, Kaissling B, Riegger G, Kurtz A (1994): Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol* 266(5 Pt 2): F738-45.
- Hong W (2005): SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* 1744(2): 120-44.
- Hu K, Carroll J, Fedorovich S, Rickman C, Sukhodub A, Davletov B (2002): Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion. *Nature* 415(6872): 646-50.
- Ichihara A, Imig JD, Navar LG (1999): Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension* 34(4 Pt 2): 843-7.
- Ichihara A, Suzuki H, Murakami M, Naitoh M, Matsumoto A, Saruta T (1995): Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* 133(5): 569-77.
- Ichikawa A (1965): Fine Structural Changes in Response to Hormonal Stimulation of the Perfused Canine Pancreas. *J Cell Biol* 24: 369-85.

- Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T (1999): Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7): 544-9.
- Jager D, Stockert E, Jager E, Gure AO, Scanlan MJ, Knuth A, Old LJ, Chen YT (2000): Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library. *Cancer Res* 60(13): 3584-91.
- Jahn R (2000): Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron* 27(2): 201-4.
- Jahn R, Grubmuller H (2002): Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 14(4): 488-95.
- Jahn R, Scheller RH (2006): SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 631-43.
- Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A (1997a): Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29(5): 1148-55.
- Jensen BL, Lehle U, Muller M, Wagner C, Kurtz A (1998): Interleukin-1 inhibits renin gene expression in As4.1 cells but not in native juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 436(5): 673-8.
- Jensen BL, Rasch R, Nyengaard JR, Skott O (1997b): Giant renin secretory granules in beige mouse renal afferent arterioles. *Cell Tissue Res* 288(2): 399-406.
- Kasai K, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Mizutani S, Zhao S, Kikuta T, Kasai H, Nagamatsu S, Gomi H, Izumi T (2005): Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J Clin Invest* 115(2): 388-96.
- Keeton TK, Campbell WB (1980): The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 32(2): 81-227.
- Kelly RB (1985): Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230(4721): 25-32.
- Kelly RB (1993): Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 72 Suppl: 43-53.

- Kikkawa Y, Yamanaka N, Tada J, Kanamori N, Tsumura K, Hosoi K (1998): Prorenin processing and restricted endoproteolysis by mouse tissue kallikrein family enzymes (mK1, mK9, mK13, and mK22). *Biochim Biophys Acta* 1382(1): 55-64.
- Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Briggs JP, Schnermann J (2007a): Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50(1): 103-9.
- Kim SM, Chen L, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J (2007b): Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1): F415-22.
- Kimura K, Inokuchi S, Sugaya T, Suzuki N, Yoneda H, Shirato I, Mise N, Oba S, Miyashita K, Tojo A, Hirata Y, Goto A, Sakai T, Murakami K, Omata M (1997): Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation. *Kidney Int Suppl* 63: S201-4.
- King JA, Lush DJ, Fray JC (1993): Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am J Physiol* 265(2 Pt 1): C305-20.
- Kirchheim HR, Finke R, Hackenthal E, Lowe W, Persson P (1985): Baroreflex sympathetic activation increases threshold pressure for the pressure-dependent renin release in conscious dogs. *Pflügers Arch* 405(2): 127-35.
- Klar J, Vitzthum H, Kurtz A (2004): Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(2): F349-55.
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007): The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59(3): 251-87.
- Kompanowska-Jezierska E, Wolff H, Kuczeriszka M, Gramsbergen JB, Walkowska A, Johns EJ, Bie P (2008): Renal nerves and nNOS: roles in natriuresis of acute isovolumetric sodium loading in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(4): R1130-9.
- Kon Y, Hashimoto Y, Murakami K, Sugimura M (1992): An immunoelectron-microscopical observation of mouse juxtaglomerular cells in the case of experimental hydronephrosis. *Acta Anat (Basel)* 144(4): 354-62.
- Kurtz A (1986): Transmembrane signalling of atrial natriuretic peptide in rat renal juxtaglomerular cells. *Klin Wochenschr* 64 Suppl 6: 37-41.

- Kurtz A (1989): Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 113: 1-40.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C (1986a): Effect of synthetic atrial natriuretic peptide on rat renal juxtaglomerular cells. *J Hypertens Suppl* 4(2): S57-60.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C (1988a): Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int* 33(4): 798-803.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Taugner R, Bauer C (1986b): Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13): 4769-73.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pratz J, Cavero I (1988b): Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *J Cardiovasc Pharmacol* 12(6): 658-63.
- Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Kieninger M, Wagner C (1998a): Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol* 274(4 Pt 2): F709-17.
- Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Wagner C (1998b): Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4743-7.
- Kurtz A, Kaissling B, Busse R, Baier W (1991): Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 88(4): 1147-54.
- Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Millberg BI, Gnadinger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hokfelt T, Fischer JA (1988c): Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J Clin Invest* 82(2): 538-43.
- Kurtz A, Penner R (1989): Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(9): 3423-7.
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Bauer C (1984): Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane? *Biochem Biophys Res Commun* 124(2): 359-66.

- Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal E, Bauer C (1986c): Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol* 250(4 Pt 1): C563-71.
- Kurtz A, Schweda F (2006): Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(4): F797-805.
- Kurtz A, Wagner C (1998): Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2): F849-62.
- Kurtz A, Wagner C (1999): Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol* 202(Pt 3): 219-25.
- Lacasse J, Ballak M, Mercure C, Gutkowska J, Chapeau C, Foote S, Menard J, Corvol P, Cantin M, Genest J (1985): Immunocytochemical localization of renin in juxtaglomerular cells. *J Histochem Cytochem* 33(4): 323-32.
- Lang J (1999): Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259(1-2): 3-17.
- Lapointe JY, Bell PD, Cardinal J (1990): Direct evidence for apical  $\text{Na}^+ : 2\text{Cl}^- : \text{K}^+$  cotransport in macula densa cells. *Am J Physiol* 258(5 Pt 2): F1466-9.
- Lee JC, Hurley S, Hopper J, Jr. (1966): Secretory activity of the juxtaglomerular granular cells of the mouse. Morphologic and enzyme histochemical observations. *Lab Invest* 15(9): 1459-76.
- Leveque C, Hoshino T, David P, Shoji-Kasai Y, Leys K, Omori A, Lang B, el Far O, Sato K, Martin-Moutot N, et al. (1992): The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8): 3625-9.
- Lindau M, Gomperts BD (1991): Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells. *Biochim Biophys Acta* 1071(4): 429-71.
- Lollike K, Lindau M, Calafat J, Borregaard N (2002): Compound exocytosis of granules in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 71(6): 973-80.
- Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP (1991): Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol* 260(4 Pt 2): F486-93.

- Maillard MP, Tedjani A, Perregaux C, Burnier M (2009): Calcium-sensing receptors modulate renin release in vivo and in vitro in the rat. *J Hypertens* 27(10): 1980-7.
- Malhotra V, Orci L, Glick BS, Block MR, Rothman JE (1988): Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* 54(2): 221-7.
- Marchant C, Brown L, Sernia C (1993): Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(3): 449-55.
- Marks MS, Seabra MC (2001): The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 738-48.
- Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G, Triggiani M (1997): Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 114(3): 207-17.
- Martinez I, Chakrabarti S, Hellevik T, Morehead J, Fowler K, Andrews NW (2000): Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol* 148(6): 1141-49.
- Marz KE, Lauer JM, Hanson PI (2003): Defining the SNARE complex binding surface of alpha-SNAP: implications for SNARE complex disassembly. *J Biol Chem* 278(29): 27000-8.
- Matos MF, Rizo J, Sudhof TC (2000): The relation of protein binding to function: what is the significance of munc18 and synaptotagmin binding to syntaxin 1, and where are the corresponding binding sites? *Eur J Cell Biol* 79(6): 377-82.
- McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, Sollner TH, Rothman JE (2000): Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407(6801): 153-9.
- Melia TJ, Weber T, McNew JA, Fisher LE, Johnston RJ, Parlati F, Mahal LK, Sollner TH, Rothman JE (2002): Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *J Cell Biol* 158(5): 929-40.
- Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux JP, Corvol P (1983): Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens A* 5(7-8): 1005-19.
- Mendez M, Gross KW, Glenn ST, Garvin JL, Carretero OA (2011): Vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP2) mediates cAMP-stimulated renin release in mouse juxtaglomerular cells. *J Biol Chem* 286(32): 28608-18.

- Mercure C, Jutras I, Day R, Seidah NG, Reudelhuber TL (1996): Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension* 28(5): 840-6.
- Mercure C, Ramla D, Garcia R, Thibault G, Deschepper CF, Reudelhuber TL (1998): Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett* 422(3): 395-9.
- Misura KM, Bock JB, Gonzalez LC, Jr., Scheller RH, Weis WI (2002): Three-dimensional structure of the amino-terminal domain of syntaxin 6, a SNAP-25 C homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9184-9.
- Mizuno K, Tolmachova T, Ushakov DS, Romao M, Abrink M, Ferenczi MA, Raposo G, Seabra MC (2007): Rab27b regulates mast cell granule dynamics and secretion. *Traffic* 8(7): 883-92.
- Moe O, Tejedor A, Campbell WB, Alpern RJ, Henrich WL (1991): Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *Am J Physiol* 260(4 Pt 1): E521-5.
- Montecucco C, Schiavo G, Pantano S (2005): SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci* 30(7): 367-72.
- Morgan A, Burgoyne RD (1997): Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse. *Semin Cell Dev Biol* 8(2): 141-9.
- Morris BJ (1992): Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10(3): 209-14.
- Mullins LJ, Payne CM, Kotelevtseva N, Brooker G, Fleming S, Harris S, Mullins JJ (2000): Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *J Biol Chem* 275(51): 40378-84.
- Nausch LW, Ledoux J, Bonev AD, Nelson MT, Dostmann WR (2008): Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(1): 365-70.
- Nemoto T, Kimura R, Ito K, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001): Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nat Cell Biol* 3(3): 253-8.



- Neves FA, Duncan KG, Baxter JD (1996): Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* 27(3 Pt 2): 514-7.
- Ng KK, Vane JR (1967): Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* 216(5117): 762-6.
- Nguyen G (2011): Renin and prorenin receptor in hypertension: what's new? *Curr Hypertens Rep* 13(1): 79-85.
- Nichols BJ, Ungermann C, Pelham HR, Wickner WT, Haas A (1997): Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387(6629): 199-202.
- Nicholson KL, Munson M, Miller RB, Filip TJ, Fairman R, Hughson FM (1998): Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. *Nat Struct Biol* 5(9): 793-802.
- Ogawa K, Yamasato M, Taniguchi K (1995): Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys. *Anat Rec* 243(3): 336-46.
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Garvin JL, Harding P, Beierwaltes WH (2007a): Expression and function of the calcium-sensing receptor in juxtaglomerular cells. *Hypertension* 50(4): 737-43.
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Harding P, Garvin JL, Beierwaltes WH (2007b): Adenylyl cyclase isoform v mediates renin release from juxtaglomerular cells. *Hypertension* 49(3): 618-24.
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Harding P, Garvin JL, Beierwaltes WH (2007c): Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension* 49(1): 162-9.
- Ozaki K, Maeda H, Nishikawa T, Nishimura M, Narama I (1994): Chediak-Higashi syndrome in rats: light and electron microscopical characterization of abnormal granules in beige rats. *J Comp Pathol* 110(4): 369-79.
- Pan L, Wang Y, Jones CA, Glenn ST, Baumann H, Gross KW (2005): Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(1): F117-24.
- Parlati F, McNew JA, Fukuda R, Miller R, Sollner TH, Rothman JE (2000): Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* 407(6801): 194-8.

- Pastural E, Ersoy F, Yalman N, Wulffraat N, Grillo E, Ozkinay F, Tezcan I, Gedikoglu G, Philippe N, Fischer A, de Saint Basile G (2000): Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics* 63(3): 299-306.
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006): Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86(3): 747-803.
- Paumet F, Le Mao J, Martin S, Galli T, David B, Blank U, Roa M (2000): Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol* 164(11): 5850-7.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC (2001): Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313(4): 889-901.
- Perin MS, Brose N, Jahn R, Sudhof TC (1991): Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem* 266(1): 623-9.
- Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R, Sudhof TC (1990): Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345(6272): 260-3.
- Persson PB (2003): Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol* 552(Pt 3): 667-71.
- Persson PB, Skalweit A, Thiele BJ (2004): Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol Scand* 181(4): 375-81.
- Peter S (1976): Ultrastructural studies on the secretory process in the epithelioid cells of the juxtaglomerular apparatus. *Cell Tissue Res* 168(1): 45-53.
- Peters J, Clausmeyer S (2002): Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* 34(12): 1561-8.
- Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ (1991a): Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173(5): 1099-109.
- Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ (1991b): Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349(6311): 669-76.

- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH (2004): Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(2): F329-35.
- Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan Y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, Bell PD (2003): Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest* 112(1): 76-82.
- Pfeffer SR (2001): Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol* 11(12): 487-91.
- Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C (1985): Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127(3): 903-10.
- Phillips MI, Sumners C (1998): Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept* 78(1-3): 1-11.
- Pickett JA, Campos-Toimil M, Thomas P, Edwardson JM (2007): Identification of SNAREs that mediate zymogen granule exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 359(3): 599-603.
- Pickett JA, Edwardson JM (2006): Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* 7(2): 109-16.
- Piggott LA, Hassell KA, Berkova Z, Morris AP, Silberbach M, Rich TC (2006): Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments. *J Gen Physiol* 128(1): 3-14.
- Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK, Bennett MK (1998): The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol* 5(9): 765-9.
- Porter JP, Reid IA, Said SI, Ganong WF (1982): Stimulation of renin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Am J Physiol* 243(3): F306-10.
- Porter JP, Said SI, Ganong WF (1983): Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells. *Neuroendocrinology* 36(5): 404-8.
- Quinn SJ, Williams GH (1988): Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 50: 409-26.

- Rasch R, Jensen BL, Nyengaard JR, Skott O (1998): Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system. *Cell Tissue Res* 292(3): 563-71.
- Re RN (2004): Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am* 88(1): 19-38.
- Risselada HJ, Grubmuller H (2012): How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr Opin Struct Biol* 22(2): 187-96.
- Ryan GB, Alcorn D, Coghlan JP, Hill PA, Jacobs R (1982): Ultrastructural morphology of granule release from juxtaglomerular myoepithelioid and peripolar cells. *Kidney Int Suppl* 12: S3-8.
- Ryan MJ, Gross KW, Hajduczuk G (2000): Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(4): E823-9.
- Sallstrom J, Carlstrom M, Jensen BL, Skott O, Brown RD, Persson AE (2008): Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release but normal blood pressure. *Am J Hypertens* 21(1): 111-6.
- Saussine C, Judes C, Massfelder T, Musso MJ, Simeoni U, Hannedouche T, Helwig JJ (1993): Stimulatory action of parathyroid hormone on renin secretion in vitro: a study using isolated rat kidney, isolated rabbit glomeruli and superfused dispersed rat juxtaglomerular cells. *Clin Sci (Lond)* 84(1): 11-9.
- Savoia C, D'Agostino M, Lauri F, Volpe M (2011): Angiotensin type 2 receptor in hypertensive cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20(2): 125-32.
- Scepek S, Lindau M (1993): Focal exocytosis by eosinophils--compound exocytosis and cumulative fusion. *EMBO J* 12(5): 1811-7.
- Schiavo G, Gmachl MJ, Stenbeck G, Sollner TH, Rothman JE (1995): A possible docking and fusion particle for synaptic transmission. *Nature* 378(6558): 733-6.
- Schluter OM, Basu J, Sudhof TC, Rosenmund C (2006): Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 26(4): 1239-46.
- Schnermann J (1998): Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* 274(2 Pt 2): R263-79.

- Schnermann J, Levine DZ (2003): Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol* 65: 501-29.
- Scholz H, Hamann M, Gotz KH, Kurtz A (1994): Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflugers Arch* 428(2): 173-8.
- Scholz H, Kurtz A (1993): Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney. *J Clin Invest* 91(3): 1088-94.
- Schunkert H, Ingelfinger JR, Jacob H, Jackson B, Bouyounes B, Dzau VJ (1992): Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II. *Am J Physiol* 263(5 Pt 1): E863-9.
- Schweda F, Kurtz A (2004): Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* 181(4): 383-90.
- Schweda F, Wagner C, Kramer BK, Schnermann J, Kurtz A (2003): Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(4): F770-7.
- Segev N (2001): Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol* 13(4): 500-11.
- Sever S, Damke H, Schmid SL (2000): Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 1(5): 385-92.
- Sharp MG, Fettes D, Brooker G, Clark AF, Peters J, Fleming S, Mullins JJ (1996): Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice. *Hypertension* 28(6): 1126-31.
- Shen J, Tareste DC, Paumet F, Rothman JE, Melia TJ (2007): Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell* 128(1): 183-95.
- Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki M, Takai Y (1993): Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol Cell Biol* 13(4): 2061-8.
- Sigmund CD, Gross KW (1991): Structure, expression, and regulation of the murine renin genes. *Hypertension* 18(4): 446-57.

- Skinner SL, McCubbin JW, Page IH (1964): Control of Renin Secretion. *Circ Res* 15: 64-76.
- Skott O (1986): Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflugers Arch* 407(1): 41-5.
- Skott O, Briggs JP (1987): Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237(4822): 1618-20.
- Skott O, Taugner R (1987): Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules. *Cell Tissue Res* 249(2): 325-9.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993a): A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75(3): 409-18.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993b): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418): 318-24.
- Soltész BM, Gomba S, Szokol M (1979): Lysosomal enzymes in the juxtaglomerular cell granules. *Experientia* 35(4): 533-4.
- Somers G, Blondel B, Orci L, Malaisse WJ (1979): Motile events in pancreatic endocrine cells. *Endocrinology* 104(1): 255-64.
- Sorensen JB (2004): Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448(4): 347-62.
- Soubrier F, Hubert C, Testut P, Nadaud S, Alhenc-Gelas F, Corvol P (1993): Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J Hypertens* 11(5): 471-6.
- Steinhardt RA, Alderton JM (1982): Calmodulin confers calcium sensitivity on secretory exocytosis. *Nature* 295(5845): 154-5.
- Sudhof TC (2002): Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 277(10): 7629-32.
- Sudhof TC (2004): The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509-47.

- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998): Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395(6700): 347-53.
- Takagi M, Matsuoka H, Atarashi K, Yagi S (1988): Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochem Biophys Res Commun* 157(3): 1164-8.
- Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Miwa A, Kishimoto T, Kojima T, Abe T, Kasai H (2004): Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. *J Cell Biol* 165(2): 255-62.
- Takai Y, Sasaki T, Shirataki H, Nakanishi H (1996): Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes Cells* 1(7): 615-32.
- Taugner C, Poulsen K, Hackenthal E, Taugner R (1979): Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochemistry* 62(1): 19-27.
- Taugner R, Buhrle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R (1984a): Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib Nephrol* 43: 76-101.
- Taugner R, Buhrle CP, Nobiling R (1984b): Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 237(3): 459-72.
- Taugner R, Kim SJ, Murakami K, Waldherr R (1987): The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. *Histochemistry* 86(3): 249-53.
- Taugner R, Metz R (1986): Development and fate of the secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells. *Cell Tissue Res* 246(3): 595-606.
- Taugner R, Whalley A, Angermüller S, Buhrle CP, Hackenthal E (1985): Are the renin-containing granules of juxtaglomerular epithelioid cells modified lysosomes? *Cell Tissue Res* 239(3): 575-87.
- Thorn P, Gaisano H (2012): Molecular control of compound Exocytosis: A key role for VAMP8. *Commun Integr Biol* 5(1): 61-3.
- Thureson-Klein A (1983): Exocytosis from large and small dense cored vesicles in noradrenergic nerve terminals. *Neuroscience* 10(2): 245-59.

- Todorov V, Muller M, Schweda F, Kurtz A (2002): Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5): R1046-51.
- Tolmachova T, Anders R, Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM, Huxley C, Seabra MC (2004): A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol Biol Cell* 15(1): 332-44.
- Trifaró JM, Gasman S, Gutierrez LM (2008): Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192(2): 165-72.
- Tsuboi T, Fukuda M (2006): Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2196-203.
- Tsuboi T, McMahon HT, Rutter GA (2004): Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavicapture") exocytosis in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 279(45): 47115-24.
- Van Dongen R, Peart WS (1974): Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br J Pharmacol* 50(1): 125-9.
- Vander AJ, Geelhoed GW (1965): Inhibition of renin secretion by angiotensin. II. *Proc Soc Exp Biol Med* 120(2): 399-403.
- Vander AJ, Miller R (1964): Control of Renin Secretion in the Anesthetized Dog. *Am J Physiol* 207: 537-46.
- Vandongen R, Peart WS, Boyd GW (1973): Andrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney. *Circ Res* 32(2): 290-6.
- Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A, Schweda F (2007): Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100(4): 556-63.
- Wagner C, Kurtz A (1998): Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7(4): 437-41.
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A (1998): Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102(8): 1576-82.



- Wang CC, Ng CP, Lu L, Atlashkin V, Zhang W, Seet LF, Hong W (2004): A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev Cell* 7(3): 359-71.
- Weinberger MH, Aoi W, Henry DP (1975): Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. *Circ Res* 37(3): 318-24.
- West AE, Neve RL, Buckley KM (1997): Targeting of the synaptic vesicle protein synaptobrevin in the axon of cultured hippocampal neurons: evidence for two distinct sorting steps. *J Cell Biol* 139(4): 917-27.
- Wilson DW, Wilcox CA, Flynn GC, Chen E, Kuang WJ, Henzel WJ, Block MR, Ullrich A, Rothman JE (1989): A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* 339(6223): 355-9.
- Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthi A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, Schnermann J (2000): Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem* 275(48): 37922-9.
- Zeng Q, Tran TT, Tan HX, Hong W (2003): The cytoplasmic domain of Vamp4 and Vamp5 is responsible for their correct subcellular targeting: the N-terminal extension of VAMP4 contains a dominant autonomous targeting signal for the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 278(25): 23046-54.
- Zerial M, McBride H (2001): Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 107-17.
- Zucker RS (1996): Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17(6): 1049-55.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

**Abb. 2:** Struktur von SNAREs.

**Abb. 3:** Der SNARE-Zyklus.

**Abb. 4:** Hypothetische Übergangsstadien der SNARE-vermittelten Membranfusion nach der „Stalk“-Theorie.

**Abb. 5:** Compound-Exozytose

**Abb. 6:** 3-Dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, unstimuliert)

**Abb. 7:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, unstimuliert)

**Abb. 8:** IPN-Protokoll von Wildtyp-Nieren (n=3)

**Abb. 9:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 3 min stimuliert mit Iso)

**Abb. 10:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 3 min stimuliert mit Iso)

**Abb. 11:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 3 min stimuliert mit Iso)

**Abb. 12:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 6 min stimuliert mit EGTA)

**Abb. 13:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 6 min stimuliert mit EGTA)

**Abb. 14:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 6 min stimuliert mit EGTA)

**Abb. 15:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 6 min stimuliert mit EGTA)

**Abb. 16:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)

**Abb. 17:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)

**Abb. 18:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)

**Abb. 19:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 10 min stimuliert mit Iso + EGTA)

**Abb. 20:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)

**Abb. 21:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)

**Abb. 22:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)

**Abb. 23:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 12 min stimuliert, davon 6min Iso und 6 min Iso + EGTA)

**Abb. 24:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert, 10 min stimuliert, 12 min stimuliert)

**Abb. 25:** 3-Dimensionale Rekonstruktion einer JG-Zelle (Wildtyp, 15 min stimuliert mit Iso + EGTA)

**Abb. 26:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Wildtyp, 15 min stimuliert mit Iso + EGTA)

**Abb. 27:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert, 10 min stimuliert, 12 min stimuliert, 15 min stimuliert)

**Abb. 28:** 3-dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Beige, unstimuliert)

**Abb. 29:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Beige, unstimuliert)

**Abb. 30:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert, Beige unstimuliert)

**Abb. 31:** IPN-Protokoll von Beige-Nieren (n=3)

**Abb. 32:** 3-dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Beige, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)

**Abb. 33:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Beige, 12 min stimuliert, davon 6 min Iso und 6 min Iso + EGTA)

**Abb. 34:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und 12 min stimuliert, Beige unstimuliert und 12 min stimuliert)

**Abb. 35:** 3-dimensionale Teilrekonstruktion einer JG-Zelle (Ren-1d-Cre/Cre, unstimuliert)

**Abb. 36:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer JG-Zelle (3800 X, Ren-1d-Cre/Cre, unstimuliert)

**Abb. 37:** Volumen- und Oberflächenberechnungen (Wildtyp unstimuliert und Ren-1d-Cre/Cre unstimuliert)

**Abb. 38:** Immunhistochemische Färbungen an histologischen Paraffinschnitten (5 µm) bei 400-facher Vergrößerung

**Abb. 39:** Immunhistochemische Färbungen an histologischen Paraffinschnitten (5 µm) bei 400-facher Vergrößerung

**Tab. 1:** Immunhistochemische Färbungen

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

### Physikalische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung (gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Meter
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
V	Volumen

### Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo ( $1 \times 10^3$ )
m	milli ( $1 \times 10^{-3}$ )
µ	micro ( $1 \times 10^{-6}$ )
n	nano ( $1 \times 10^{-9}$ )
p	pico ( $1 \times 10^{-12}$ )
f	femto ( $1 \times 10^{-15}$ )

**Chemische und biologische Größen und Einheiten**

bp	Basenpaare
I.E.	internationale Einheit
M	molar
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
U	enzymatische Einheit (Unit)
$\alpha$ SMA	$\alpha$ smooth muscle actin
$\alpha,\beta,\gamma$ -SNAP	$\alpha,\beta,\gamma$ -soluble NSF acceptor proteins
A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cy2	Carbocyanin
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	und andere (et alii)
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
H <sub>2</sub> O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HS	Pferdeserum (horse serum)
Ig	Immunglobulin
i.p.	intra peritoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Iso	Isoproterenol

JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JG-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MD	Macula densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO	di-Natriumhydrogenphosphat
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-β	platelet derived growth factor-beta
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SNARE	SNAP-receptor
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)amino-methan
TRITC	Tetramethylrhodamin
üN	über Nacht
V.	Vena(e)
VEGF	vascular endothelial growth factor

**Sonstige**

3D	dreidimensional
%	Prozent
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
bzw.	beziehungsweise

### **7.3. Veröffentlichungen**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Steppan D, Zuegner A, Kurtz A: Structural analysis of renin release. Akzeptiert von Kidney Int

### **7.4. Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die in den vergangenen Jahren zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz nicht nur für die Vergabe dieses Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmittel und Geräte, sondern auch für sein stetiges Interesse und seine andauernde Geduld. Seine kompetente Beratung trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Großer Dank gilt auch Anita Zügner, Marlies Hamann, und Robert Götz, ohne deren fachliche Kompetenz und technische Unterstützung ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte ebenfalls Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner, Frau Dr. Melanie Gerl und Herrn Dr. Björn Neubauer für deren fachliche und oft auch moralische Unterstützung danken. Ihre zahlreichen guten Ratschläge und hilfreichen Tipps haben die Qualität dieser Arbeit positiv beeinflusst. Besonders danke ich Frau Dr. Katharina Machura für das wiederholte Durchlesen der Arbeit und ihre Hilfe bei inhaltlichen und fachlichen Fragen.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Ramona und meinen Eltern Waltraud und Egbert.

Ramona, du hast in guten und in schlechten Zeiten immer zu mir gehalten. Deine bedingungslose Unterstützung und Zuneigung haben mir nicht nur beim Erstellen dieser Arbeit, sondern auch in allen anderen Lebenslagen Halt und Sicherheit gegeben. Dafür, dass du immer für mich da bist, danke ich dir von ganzem Herzen.

Waltraud und Egbert, ohne eure Unterstützung und Bestärkung wäre ein Studium und die daraus resultierende Arbeit nicht möglich gewesen. Ich schulde euch ebenfalls Dank für euer Verständnis und eure Rücksichtnahme während der langen Studienzeit und dem darauffolgenden Anfertigen der Dissertation.